

Neue Bioaktivitäten von *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Lamiaceae) –
Aktivitätsprofiling, Methodenentwicklung und Charakterisierung
isolierter Verbindungen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Apothekerin Kathrin Dittmann
geboren am 03. Juni 1975 in Sömmerda

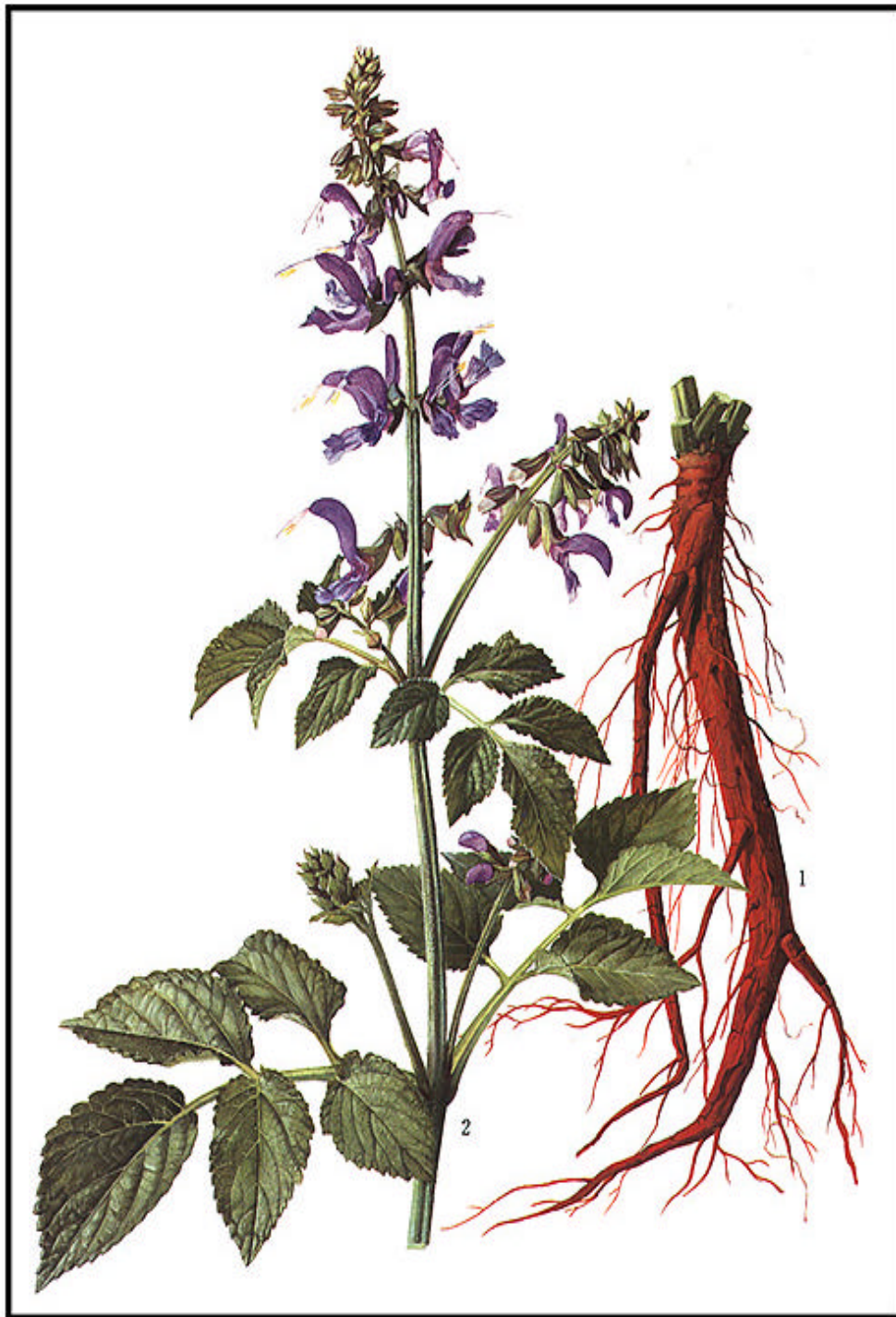
Gutachter:

1. Prof. Dr. M. Hamburger
2. Prof. Dr. G. Scriba
3. Prof. Dr. I. Merfort

Tag der mündlichen Prüfung: 2. März 2004

Tag der öffentlichen Verteidigung: 19. März 2004

Jena, den 29. März 2004



1: Danshen (*Salviae miltiorrhizae radix*)

2: *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Lamiaceae)

(Quelle: <http://www.itmonline.org/arts/salvia.htm>)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1.	Zielstellung der Promotionsarbeit	5
1.2.	Neurodegenerative Erkrankungen	6
1.3.	Monoaminoxidase	10
1.4.	Bioassays zur Auffindung von Inhibitoren der Monoaminoxidase	12
1.5.	Möglichkeiten der aktivitätsbezogenen Isolierung von Naturstoffen	14
1.6.	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	16
	Systematik und Definition	16
	Inhaltsstoffe	16
	Pharmakologische Wirkungen und therapeutischer Einsatz	18

2. Materialien und Methoden

2.1.	Materialien der chemischen und biologischen Verfahren	22
2.1.1.	Allgemeine Laborgeräte	22
2.1.2.	Chromatographische und spektroskopische Geräte	23
2.1.3.	Lösungsmittel	24
2.1.4.	Chemikalien, Puffer und Reagenzien	24
2.1.5.	Drogenmaterial	26
2.1.6.	Ratten	26
2.1.7.	Medien	26
2.1.8.	Mikroorganismen – Stämme	27
2.1.9.	Vektoren	28
2.1.10.	Enzyme	28
2.1.11.	Primer für PCR und Sequenzierung	28
2.2.	Rattenleberpräparation – Gewinnung von MAO A und B	29
2.3.	Durchführung des Monoaminoxidase – Test I	30
2.4.	Anzucht der Mikroorganismen	31
2.5.	Methoden zur Klonierung von MAO A	31
2.5.1.	Isolierung von Plasmid – DNA	31
2.5.2.	Polymerasekettenreaktion	32
2.5.3.	Spaltung der DNA mit Restriktionsendonukleasen	32

2.5.4.	Ligation	32
2.5.5.	Transformationen	33
2.6.	DNA – Sequenzierung	34
2.7.	Fermentation von <i>S. cerevisiae</i>	34
2.8.	Gewinnung des rekombinanten Enzyms MAO A aus <i>S. cerevisiae</i>	35
2.8.1.	Zellaufschluss und Gewinnung der Mitochondrien	35
2.8.2.	Proteinisolierung aus den Mitochondrien	35
2.8.3.	Ammoniumsulfat – Fällung	36
2.8.4.	Dialyse	36
2.8.5.	Glutathion – Sepharose TM 4B	36
2.9.	Charakterisierung des Enzyms im Dialysat	37
2.9.1.	SDS – Polyacrylamid – Gelelektrophorese (SDS – Page)	37
2.9.2.	Bestimmung der kinetischen Daten	37
2.9.3.	Selektive Hemmung	38
2.9.4.	Stabilitätstest	38
2.10.	Durchführung des Monoaminoxidase – Test II	38
2.11.	Analytische und chemische Methoden	39
2.11.1.	Extraktgewinnung	39
2.11.2.	Chromatographische Methoden	40
2.11.2.1.	Dünnschichtchromatographie	40
2.11.2.2.	Säulenchromatographie (SC)	40
2.11.2.3.	Niederdruckflüssigchromatographie (LPLC)	41
2.11.2.4.	Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)	41
2.11.2.5.	Gelchromatographie (Gelpermeationschromatographie)	41
2.11.3.	Mikrofraktionierung und Probenaufbereitung	42
2.11.3.1.	Mikrofraktionierung für MAO – Test	42
2.11.3.2.	Mikrofraktionierung für Tests im Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ)	43
2.11.4.	Spektroskopische Verfahren	43
2.11.4.1.	UV – Vis – Spektroskopie (UV – Vis)	43
2.11.4.2.	Massenspektroskopie (MS) und LC – MS	44
2.11.4.3.	Nuclear – Magnetic – Resonance – Spektroskopie (NMR)	44
2.11.5.	Agarose – Gelelektrophorese	44
2.11.6.	SDS – Polyacrylamid – Gelelektrophorese und Coomassie – Färbung	44

2.11.7.	Quantitative Protein – Bestimmung	45
2.12.	Isolierung der Tanshinone	45
2.12.1.	Fraktionierung des Dichlormethanextraktes	45
2.12.2.	15, 16 – Dihydrotanshinon I	46
2.12.3.	Tanshinon I	46
2.12.4.	Tanshinon IIA	46
2.12.5.	Cryptotanshinon	46
2.13.	Physikochemische Daten der Verbindungen	47
 3. Ergebnisse		
3.1.	Monoaminoxidase – Test I	49
3.1.1.	Extraktscreening	49
3.1.2.	Mikrofraktionierung	50
3.1.3.	Testung der Reinsubstanzen	52
3.2.	Fraktionierung des Dichlormethanextraktes und Gewinnung der Reinsubstanzen	53
3.3.	Klonierung und Gewinnung rekombinanter Monoaminoxidase A	54
3.3.1.	Klonierung	54
3.3.2.	Fermentation	56
3.3.3.	Isolierung	57
3.3.4.	Versuche zur Gewinnung des Fusionsproteins	58
3.4.	Charakterisierung der rekombinanten MAO A	59
3.4.1.	Enzymkinetik	59
3.4.2.	Enzymhemmung	61
3.4.3.	Stabilitätstest	61
3.4.4.	Berechnung der Enzymaktivität	62
3.5.	Monoaminoxidase – Test II	63
3.5.1.	Mikrofraktionierung und Testung gespikter Pflanzenextrakte	63
3.5.2.	Mikrofraktionierung des Dichlormethanextraktes von <i>Salviae miltiorrhizae radix</i>	66
3.5.3.	Testung der Tanshinone	67
3.6.	Weitere Bioaktivitäten von <i>Salvia miltiorrhiza</i>	68
3.6.1.	Hemmung der induzierbaren NO – Synthetase (iNOS)	69

4. Diskussion	71
5. Summary	82
6. Abkürzungsverzeichnis	85
7. Liste der verwendeten Literatur	88
8. Liste der wissenschaftlichen Beiträge	101
9. Anhang	103
9.1. Danksagung	103
9.2. Lebenslauf	104
9.3. Erklärung	105

1. Einleitung

1.1. Zielstellung der Promotionsarbeit

Der allgemeine Titel der vorliegenden Promotionsarbeit lautete zunächst: „Isolierung, Identifizierung von ZNS – aktiven Sekundärmetaboliten aus Pflanzen und entomophagen Pilzen“, wobei der Begriff ZNS – Aktivität im engen Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen steht.

Hinsichtlich der Identifizierung von Molekülen mit ZNS – Aktivität wurden in der Arbeitsgruppe bereits verschiedene Testsysteme eingesetzt (Schmidt et al., 2003), die der Grundlagenforschung in einem jeweils eng fokussierten Bereich dienen. Dazu gehörte die Prüfung auf NMDA antagonistische Wirkung in stabil transfizierten Fibroblasten, die Testung auf neuritogene Aktivität in PC12 – Zellen, das Screening auf Radikalfängereigenschaften und ein Bioassay zur Identifizierung von Inhibitoren der Monoaminoxidase (MAO), ein Enzym, welches auch mit neurodegenerativen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht wird.

Die Auswahl der zu testenden Extrakte erfolgte nach ethnologischen Gesichtspunkten und anschließender intensiver Literaturrecherche.

Aufgrund seiner vielfältigen pharmakologischen Eigenschaften, auch im Hinblick auf neurodegenerative Erkrankungen postulierte Aktivitäten, wurde der chinesische Rotwurzelsalbei *Salvia miltiorrhiza* Bunge ausgewählt.

Sowohl der polare Methanol – als auch der lipophile Dichlormethanextrakt von *Salvia* wurden in den erwähnten Testsystemen geprüft. Eine eindeutige Bioaktivität konnte nur dem Dichlormethanextrakt im Monoaminoxidase – Assay nachgewiesen werden. Auf diesem Resultat aufbauend gestalteten sich die nachfolgenden Arbeiten.

Hinsichtlich des methodischen Teiles dieses Projektes sollte das Verfahren der HPLC – basierten Auffindung von biologisch aktiven Naturstoffen Anwendung finden. Dazu musste ein geeignetes Mikrofraktionierungs – und Aufbereitungsschema der erhaltenen Fraktionen entwickelt werden, welches anschließend zur Identifizierung von Inhibitoren der Monoaminoxidase genutzt werden konnte.

In Erweiterung der ursprünglichen Zielstellung war es außerdem Ziel dieser Arbeit, Extrakte von *Salvia miltiorrhiza* in Testsystemen, die im Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen bzw. im Rahmen der Krebsprävention relevant sind, zu prüfen. Dabei sollte zur

Identifizierung von Bioaktivitäten ebenfalls die Methode des HPLC – Aktivitätsprofiling eingesetzt werden. In der Arbeitsgruppe war bereits, unter Nutzung dieser Methode, Tryptanthrin aus *Isatis tinctoria* L. als neuartiger COX – 2/5 – LOX und iNOS – Hemmer identifiziert und charakterisiert worden.

1.2. Neurodegenerative Erkrankungen

Die Zahl der neurodegenerativen Erkrankungen, wozu die Alzheimer – Demenz, Morbus Parkinson und Morbus Huntington als die am häufigsten auftretenden und bekanntesten Krankheitsbilder gehören, steigt insbesondere in den westlichen Industrienationen stetig an. Gemeinsam dieser, meist mit einer sich verstärkenden Demenz einhergehenden Krankheiten, ist der Anstieg der Prävalenz mit fortschreitendem Alter. So liegt diese bei Morbus Alzheimer zwischen dem 65. und 75. Lebensjahr bei 3 Prozent, während sie bei den über 85 – jährigen schon auf bis zu ca. 45 Prozent angestiegen ist (Krieglstein, 2002). Beim Morbus Parkinson findet man eine Prävalenz bei den 55jährigen von 1,4 und bei den 75jährigen von 3,4 Prozent (Riess et al., 1999).

Die Abbildung 1.1. veranschaulicht deutlich die Zunahme der allgemeinen Lebenserwartung in den nächsten Jahren im Vergleich zu 1997. So wird die Zahl der über 65jährigen im Jahre 2025 auf etwa 800 Millionen, das entspricht 10 Prozent der Weltbevölkerung, angestiegen sein. Damit verbunden ist ein Anstieg der altersbedingten neurodegenerativen Erkrankungen. In Deutschland leiden z. B. bereits jetzt ca. eine Million Menschen an der Alzheimer – Krankheit. Durch die zunehmende Lebenserwartung und Alterung der geburtenstarken Jahrgänge wird in den nächsten 20 Jahren eine Zunahme auf über 2 Millionen Betroffene erwartet (Kötter und Hampel, 2003).

Gemeinsamkeit dieser Krankheiten ist, dass es sich um chronische Erkrankungen handelt, die zu schwerer Behinderung, langandauerndem Siechtum, Schmerzen, Leid und zu einer massiven Belastung der Angehörigen führen. Sie verursachen enorme direkte und indirekte Kosten, man rechnet für die jährliche Betreuung von Demenz – Patienten in Deutschland mit 40 Milliarden Euro (Krieglstein, 2002). Ihre adäquate Behandlung inklusive der psychologischen Betreuung von Patienten und Angehörigen ist meist komplex und erfordert hohe Kompetenz.

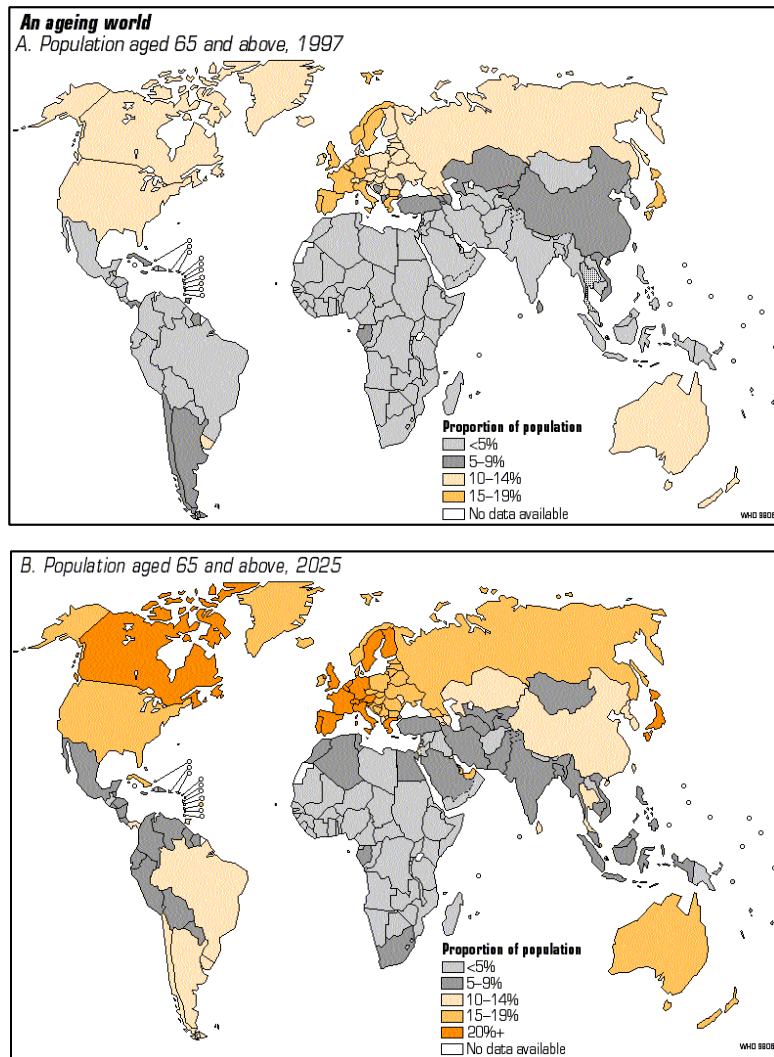


Abb. 1.1. Entwicklung der Altersstruktur der Weltbevölkerung bis zum Jahre 2025 (B) im Vergleich zu 1997 (A) Quelle: <http://www.who.int/whr2001/2001/archives/1998/>

Über Ursache und Pathogenese der Erkrankungen ist vieles noch nicht geklärt, eine Heilung ist nicht möglich. Man kann jedoch durch symptomatische Behandlung ihren Verlauf abbremsen, wenn man sie rechtzeitig erkennt und therapiert.

Am häufigsten ist die neurodegenerative Erkrankung vom Alzheimer – Typ. Sie beginnt mit kognitiven Störungen und mündet innerhalb weniger Jahre in einen vollständigen Verlust alltäglicher Kompetenzen und dem Verfall der Urteilsfähigkeit und Persönlichkeit (Kötter und Hampel, 2003). Hinsichtlich der Pathogenese dieser Demenzform ist bekannt, dass verschiedene Transmittersysteme gestört sind. Defizite wurden beschrieben für Acetylcholin, Serotonin, ? – Aminobuttersäure, Glutaminsäure, Somatostatin und Neuropeptid Y. Die Erkenntnis, dass die Synthese und Freisetzung von Acetylcholin in cholinergen Neuronen vermindert ist, begründete die cholinerge Hypothese, d.h. den Einsatz von

Acetylcholinesterasehemmstoffen wie Tracin, Donepezil, Rivastigmin und Galantamin. Allerdings können diese nur bei leichten und mittelschweren Demenzen des Morbus Alzheimer eingesetzt werden. Neben den Hemmern der Acetylcholinesterase spielen auch Calcium – und NMDA – Antagonisten in der Therapie eine Rolle, da im Rahmen der Alzheimer – Demenz die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöht ist und durch Einsatz dieser Antagonisten eine Verringerung der Ionenkonzentration möglich wird. Der NMDA – Antagonist Memantin ist derzeit das einzige Antidementivum, das für die Behandlung mittelschwerer bis schwerer Demenz zugelassen ist (Krieglstein, 2002).

Ein wichtiges neuropathologisches Charakteristikum der Alzheimer – Erkrankung ist die Bildung von Amyloidplaques im Gehirn. Eine bedeutende Rolle in diesem Zusammenhang spielt dabei das Amyloid – precursor – Protein (APP), aus welchem durch proteolytische Spaltung mittels der β – und γ – Sekretasen die Peptide A β 1-40 und A β 1-42 entstehen, von denen dann hauptsächlich A β 1-42 durch Aggregation zu den erwähnten Plaques führt. Neue therapeutische Ansätze gehen im Hinblick auf dieses Peptid in Richtung des Einsatzes von Inhibitoren der β – und γ – Sekretase, Verhinderung der A β – Oligomerisierung, Behandlung der infolge der A β – Akkumulation auftretenden Entzündungsreaktionen und der Einsatz von Chelatbildnern, um die von Cu^{2+} und Zn^{2+} abhängige Aggregation von A β zu verhindern. Weiterhin werden zur Therapie der neurodegenerativen Prozesse Antioxidantien, wie Vitamin E, neuroprotektive und neurotrope Faktoren verwendet (Mertens, 2002, Allain, 2003). Auch der Einsatz von Inhibitoren der Monoaminoxidase B wird diskutiert (Findley, 1995, Allain et al., 1997; Freedman et al., 1998; Bongioanni et al., 1996).

Die zweithäufigste der neurodegenerativen Krankheiten, der Morbus Parkinson, gilt im allgemeinen als sich eine spät manifestierende Erkrankung der Basalganglien, die meist sporadisch auftritt. Die klinische Symptomatik wird durch einen ausgeprägten Zelltod neuromelaninhaltiger Neurone in der Pars compacta der Substantia nigra hervorgerufen, der zum Dopaminmangel im Striatum führt. Andere dopaminerge Systeme sind ebenfalls beeinträchtigt. Neuropathologisch gilt der Nachweis von intrazytoplasmatischen neuronalen Einschlüssen, den sogenannten Lewy – Körperchen, in der Substantia nigra als erforderlich für die Diagnose (Riess et al., 1999). Verschiedene pathogenetische Faktoren werden für den dopaminergen Zellverlust diskutiert. Eine erhöhte oxidative Belastung der Substantia nigra pars compacta durch eine gestörte Homöostase Radikal – erzeugender und Radikal – abwehrender Reaktionen scheint in der Kaskade des dopaminergen Zelltodes die zentrale Rolle zu spielen. Die eigentlichen Ursachen sind aber immer noch unbekannt (Jenner, 1998). Die klinische Symptomatik, akinetisch – rigide Bewegungsstörungen, fakultativer Tremor,

reduzierte Stellreflexe und im späteren Verlauf kognitive, emotionale und vegetative Veränderungen, ist zumindest in den ersten Jahren mit der Gabe von L – Dopa gut beeinflussbar (Riess et al., 1999). Jedoch wird heutzutage wegen der längerfristig auftretenden unerwünschten Wirkungen (On- off – Phänomen, End – of – dose – Akinesie, Dyskinesie/Hyperkinese, psychotische Symptome) der Einsatz bei Patienten unter 70 Jahren möglichst hinausgezögert. Statt dessen werden Dopaminagonisten als Initialtherapie eingesetzt, die auch beim Auftreten von Wirkschwankungen mit einer laufenden L – Dopa – Therapie kombiniert werden. Als theoretischer Hintergrund für die Verwendung moderner Dopaminagonisten ohne Ergolinstruktur und anderen Substanzen, wie beispielsweise des Monoaminoxidase B – Hemmers Selegilin (R-(-)-Deprenyl), werden mögliche neuroprotektive Effekte erforscht. Da der krankheitsbedingte und möglicherweise durch L – Dopa geförderte Untergang dopaminerger Neurone zum zunehmenden Überwiegen exzitatorischer Glutamatrezeptoren im Striatum führt, wird die Kombination mit dem NMDA – Rezeptorantagonisten Amantadin diskutiert. Dies soll auch der Entwicklung von L – Dopa – Dyskinesien entgegenwirken. Das Therapiekonzept muss in jedem Fall ein individualisiertes sein, in der Absicht, mit der kleinstmöglichen Menge an Medikamenten auszukommen (Müller – Oeringhausen, 2003).

Die Huntington – Krankheit stellt eine weitere neurodegenerative Erkrankung dar, die auf einen Gendefekt, der zu einer Degeneration von Nervenzellen in bestimmten Hirnabschnitten führt, zurückzuführen ist. Diese Krankheit bricht normalerweise zwischen dem dreißigsten und fünfzigsten Lebensjahr aus, mit Symptomen wie Vergesslichkeit, Depressionen und frühtypischen Bewegungsstörungen. Eine Demenz tritt in der Mehrheit der Fälle auf. Einige Symptome können durch Medikamente vorübergehend gelindert werden (Lange, 2002).

Zusammenfassend sind auf dem Gebiet der neurodegenerativen Erkrankungen in den letzten Jahren eine Vielzahl neuer Erkenntnisse erlangt und bessere Therapiestrategien entwickelt worden. Das Potential dieser Krankheitsbilder hinsichtlich der Aufklärung ihrer Pathogenese und der symptomatischen oder gar ursächlichen Behandlungen ist aber immer noch nicht ausgeschöpft und stellt für die Wissenschaft eine große Herausforderung dar.

Die Grundlagenforschung unter Verwendung verschiedener geeigneter Testsysteme stellt dabei zum einen eine wichtige Voraussetzung für mögliche in vivo – Tests und zum anderen die Möglichkeit der Aufklärung von Wirkmechanismen potentieller Pharmaka dar.

1.3. Monoaminoxidase

Die Monoaminoxidase (MAO, EC 1.4.3.4) ist ein bedeutendes intrazelluläres Enzym des zentralen Nervensystem und peripherer Gewebsbereiche, welches den Abbau neuroaktiver und vasoaktiver Amine katalysiert (von Korff, 1979). MAO, lokalisiert an der äußeren Mitochondrienmembran (Greenwalt und Schnaitman, 1970), kann sowohl primäre und sekundäre als auch tertiäre Amine unter Bildung des korrespondierenden Aldehyds, Ammoniak und Wasserstoffperoxid umsetzen.

Man unterscheidet zwei Formen, die Monoaminoxidase A (MAO A) und die Monoaminoxidase B (MAO B).

MAO A und B sind gekennzeichnet durch charakteristische Abweichungen in ihrer Nukleotid- und davon abgeleitet in ihrer Aminosäuresequenz (Bach et al., 1988), Unterschiede in ihrer Substratspezifität und Inhibitorsensitivität (Singer, 1987), ungleiche Gewebe- und Zellverteilung (Levitt et al., 1982; Westlund et al., 1985, 1988) und verschiedene immunologische Eigenschaften (Denney et al., 1982; Kochersberger et al., 1985).

Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäure – Sequenzen von isolierten cDNA – Klonen (Bach et al., 1988; Powell et al., 1989; Ito et al., 1988; Kuwahara et al., 1990) zeigt einen etwa 70 %igen Grad an Identität von MAO A und B. Beide Formen enthalten FAD als Cofaktor kovalent gebundenen an Cystein 406 in MAO A und Cystein 397 in MAO B in Form einer 8-a-S-Cystein – FAD – Bindung (Kearney et al., 1971; Walker et al., 1971). Die mutmaßlichen funktionellen Bereiche der Monoaminoxidasen sind: die Dinukleotid – Bindungsstelle, eine zweite FAD – Bindungsstelle, der Fingerprint – Bereich, der kovalente Bindungsort, das aktive Zentrum und der Verankerungsbereich zur äußeren Mitochondrienmembran (Abell und Kwan, 2001).

MAO A hat eine höhere Affinität zu Noradrenalin, Adrenalin und Serotonin, und wird irreversibel durch kleinste Mengen Clorgylin und reversibel durch Moclobemid gehemmt. MAO B oxidiert vorzugsweise hydrophobe Substanzen wie Phenylethylamin und Benzylamin und wird irreversibel durch geringe Mengen Pargylin und Deprenyl inhibiert. Gemeinsame Substrate für MAO A und B sind Dopamin, Tyramin, Kynuramin und Tryptamin.

Die ungleiche Gewebsverteilung der Isoenzyme zeigt sich an folgenden Beispielen: so enthält die Plazenta vorrangig MAO A (Egashira, 1976) mit einem kleinen Anteil MAO B (Riley et al., 1989), während die Thrombocyten und Lymphocyten nur MAO B exprimieren (Bond und Cundall, 1977; Donnelly und Murphy, 1977). Weiterhin offenbarten immunhistochemische

Studien, dass MAO A in katecholaminbildenden Neuronen in Regionen des menschlichen Locus coeruleus und der Substantia nigra gebildet wird, während MAO B in serotonergen Neuronen in Bereichen der Raphae dorsalis auftritt (Westlund, 1988).

Die physiologischen Funktionen von MAO A und B sowohl in peripheren Bereichen als auch im Gehirn sind vielfältig. So kann z. B. MAO A in der Plazenta den Transfer von biogenen oder bioaktiven Aminen durch die Plazenta verringern, was zur Protektion des Feten gegenüber gesundheitsschädlichen Aminen führt. Ähnlich kann MAO B gewebe- oder zellspezifisch einen Schutz gegenüber Fremdstoffen bieten. Zudem ist durch umfangreiche Untersuchungen belegt, dass die beiden Enzyme MAO A und B einen nicht unerheblichen Anteil an der Kontrolle der Neurotransmitter – Level im Gehirn haben. So wird Serotonin in serotonergen Neuronen von MAO B nicht oxidativ deaminiert, bis die Konzentration des Amins einen sehr hohen Grenzwert erreicht. Unter normalen Bedingungen wird demnach Serotonin in die synaptischen Vesikel aufgenommen, um während der Neurotransmission freigesetzt zu werden (Abell und Kwan, 2001). Norepinephrin wird durch MAO A im menschlichen Gehirn zwar in moderaten Mengen metabolisiert (Roth et al., 1984), die Aufnahme aber in die synaptischen Vesikel ist, aufgrund des K_m – Wertes von Norepinephrin im mikromolaren Bereich, bevorzugt. Andere Studien (Glover et al., 1977) zeigten, dass Dopamin durch MAO B, welche in serotonergen Neuronen exprimiert wird, abgebaut wird. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die größte Aufgabe der Monoaminoxidasen die Verminderung oder Entfernung von Aminen ist, die keine berechtigten physiologischen Funktionen haben.

Andererseits spielen die beiden Isoenzyme auch in pathophysiologischen Geschehen des menschlichen Organismus eine unter Umständen nicht unerhebliche Rolle. So im Falle des Neurotoxins 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP), das dem Morbus Parkinson ähnliche Symptome verursachen kann (Davis et al., 1979; Langston et al. 1983). MPTP wird durch MAO B zu einem instabilen Intermediat ($MPTP^+$) oxidiert, welches einer weiteren Oxidation zur hoch reaktiven neurotoxischen Verbindung MPP^+ unterliegt (Chiba et al., 1984; Fritz et al. 1985). Die Folge ist eine Zerstörung dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra (Burns et al., 1983). Vorbehandlungen von Tieren mit Deprenyl oder Pargylin als selektive Inhibitoren von MAO B zeigten einen protektiven Effekt (Cohen et al., 1984; Langston et al., 1984), wohingegen eine Gabe von Clorgylin, als selektiver MAO A – Hemmer, keine Erfolge brachte (Heikkila et al., 1985). Beim Menschen wird Deprenyl zusammen mit L – Dopa in der Behandlung des Morbus Parkinson eingesetzt, da gezeigt werden konnte, dass an Parkinson erkrankte Patienten eine erhöhte MAO B – Aktivität in der

Substantia nigra aufweisen (Riederer und Jellinger, 1983) und die Gabe von Deprenyl die Symptomentwicklung aufhält (Knoll, 1988; Sano et al., 1997). Ebenso wird ein Einsatz des MAO B – Hemmers in der Alzheimer – Therapie diskutiert (Findley, 1995, Allain et al., 1997; Freedman et al., 1998; Bongioanni et al., 1996). Auch die Entwicklung von Pharmaka, die selektiv und reversibel MAO A hemmen, ist von beachtlichem Interesse, seitdem bekannt ist, dass ein resultierendes Ansteigen der dopaminergen Aktivität zu einem antidepressiven Effekt führt (Kato et al., 1998). Weiteres Interesse an der A – Form hat die Entdeckung eines defekten MAO A – Gens geweckt, welches ein verkürztes Enzym kodiert und bei den betreffenden Personen zu abnormalen aggressiven Verhaltensweisen führt (Brunner et al., 1993).

Die aufgeführten Beispiele machen deutlich, dass die Monoaminoxidasen im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson ebenso eine nicht unerhebliche Rolle spielen, wie bei der Behandlung bestimmter Formen der Depression. Die Entwicklung von selektiven und reversiblen Inhibitoren kann dabei einen gezielten therapeutischen Einsatz ermöglichen.

1.4. Bioassays zur Auffindung von Inhibitoren der Monoaminoxidase

Zur Ermittlung der Aktivität der Monoaminoxidasen A und B sind in den letzten Jahren eine Vielzahl von Testprotokollen entwickelt worden. Bei der Einordnung dieser einzelnen Methoden sollten die Enzymquelle und Enzymgewinnung, die Durchführung des Assays als kontinuierlicher oder diskontinuierlicher Test und die Detektionsmethode zur Bestimmung der Enzymaktivität als Beurteilungskriterien herangezogen werden.

Enzymaufbereitungen wurden meist von verschiedenen tierischen (Ratte, Rind, Schwein) Geweben, wie Gehirn, Niere oder Leber angefertigt (Lu et al., 1996), während z. B. menschliche Plazenta als Quelle für MAO A verwendet wurde (Weyler und Salach, 1985). Die Mitochondrienpräparationen, meist als enzymatische Suspension genutzt, zeigen dabei oftmals eine moderate Aktivität. Auch wirkt sich die Trübung der Aufbereitungen negativ auf die Genauigkeit von photometrischen Auswertemethoden aus. Die Problematik der relativ geringen und häufig nicht vorhersehbaren Enzymaktivität, auch von vollständig aufgereinigten Enzymen, das Interesse an einer genaueren Charakterisierung der beiden Isoenzyme, die Suche nach selektiven Inhibitoren von MAO A und B und die Ermittlung der vorliegenden Hemmmechanismen hat zur Gewinnung und Aufreinigung von rekombinanten

Enzymen aus verschiedenen Expressionssystemen geführt. Dazu gehören insbesondere Arbeiten zur Isolierung von menschlicher rekombinanter MAO A und B (Weyler et al., 1990; Newton – Vinson et al., 2000; Li et al., 2002) aus Hefen.

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität werden spektrophotometrische, fluorimetrische, luminometrische und radiometrische Verfahren als Einpunktmessung oder seltener als kontinuierliche Messungen angewandt (Zhou et al., 1996).

Radiometrische (Wurtman und Axelrod, 1963; Otsuka und Kobayashi, 1964; Tipton, 1985; Da Prada et al., 1989), fluorimetrische (Snyder und Hendley, 1968; Tipton, 1969; Tipton und Singer, 1993) und luminometrische (Tenne et al., 1985; O'Brien et al., 1993) Assays sind auf Grund ihrer hohen Sensitivität und Spezifität die am meisten genutzten Methoden zur Detektion der Aktivität. Die Ermittlung der Enzymaktivität erfolgt dabei über die Bestimmung der Konzentrationsabnahme des Substrates oder der Konzentrationszunahme des Produktes mittels der genannten Messmethoden oder auch durch Bestimmung der gebildeten H_2O_2 – Menge durch eine nachgeschaltete enzymatische Reaktion des Wasserstoffperoxids mit chromogenen (Szutowicz et al., 1984) oder fluorogenen (Snyder und Hendley, 1968) Substanzen. Diese nachgeschaltete Reaktion mit einem zweiten Enzym führt dazu, dass zum einen weitere nachteilige Interaktionsmöglichkeiten bestehen können und dass es sich hier um indirekte Bestimmungen handelt. Als weiteres Reaktionsprodukt der enzymatischen Umsetzung kann der Gehalt des gebildeten Ammoniaks direkt mittels einer Elektrode (Meyerson et al., 1978) gemessen werden, wobei die Sensitivität dieser Methode nicht sehr hoch ist. Als zweite Möglichkeit lässt sich die gebildete Ammoniakmenge indirekt über eine gekoppelte Reaktion des NADH zum NAD^+ bestimmen (Harada und Nagatsu, 1973). Radiometrische Testsysteme sind durch die hohen Sicherheitsanforderungen im Umgang mit radioaktiven Isotopen limitiert (Zhou et al., 1996).

Die Anwendung von Einpunktmessungen in Millilitermaßstab (z. B. Weissbach et al., 1960) stand am Anfang der Entwicklung von Testsystemen und wurde zunehmend von kinetischen Messungen im Mikrotiterplattenformat (z. B. Holt et al., 1997) abgelöst, was zur höheren Aussagekraft der Ergebnisse und zur besseren Reproduzierbarkeit der Daten führte.

Die meisten Protokolle sind für die Testung von Reinsubstanzen entwickelt worden. Das Screening von Gesamtextrakten und teilaufgereinigten Fraktionen kann aber zu einer Reihe von Problemen führen. Dazu gehören die Eigenfärbung von Extrakten bei photometrischen Auswertemethoden oder auch Wechselwirkungen der unbekannten Metabolite mit Bestandteilen des Testsystems. So z. B. bei der Bestimmung der Enzymaktivität über die

Menge an gebildeten Wasserstoffperoxid durch die Reaktion des H_2O_2 mit antioxidativen Substanzen.

Für das Screening von komplexen Extrakten ist somit aufgrund der erwähnten möglichen Schwierigkeiten die Anwendung von direkten kontinuierlichen Assays mit rekombinanten Enzymen und der Bestimmung der Konzentrationsänderung des Substrates oder des Produktes unter Verwendung einer der angegebenen Detektionsmethoden am besten geeignet.

1.5. Möglichkeiten der aktivitätsbezogenen Isolierung von Naturstoffen

Die Suche nach neuen pharmakologisch aktiven Verbindungen mit Hilfe des Screenings von natürlichen Ressourcen wie Pflanzenextrakten oder Mikroorganismen führte zur Entwicklung einer Vielzahl klinisch nützlicher Arzneimittel zur Behandlung verschiedenster Erkrankungen des menschlichen Organismus (Shu, 1998). Die Substanzen natürlichen Ursprungs dienen dabei in Form der Arzneidrogen oder Extrakte, direkt als Reinsubstanzen, oder als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer synthetischer Verbindungen, zur Behandlung von Krankheiten (Harvey, 2000).

Über 40 % der weltweit meist verkauften Pharmaka stammen direkt oder indirekt von Verbindungen natürlichen Ursprungs (Cragg, et al., 1997), wobei auf dem Gebiet der Therapie von Krebserkrankungen und Infektionskrankheiten sogar ca. 62 % und 75 % der Arzneistoffe nicht synthetischer Herkunft sind (Newman et al., 2003). Auch in nächster Zukunft werden natürliche Leitstrukturen für die Auffindung neuer wirksamer Pharmaka als Grundlage dienen und Metabolite von Pflanzen oder Mikroorganismen in Form von Reinsubstanzen oder Extrakten zur Behandlung menschlicher Erkrankungen zum Einsatz kommen.

Am Anfang jeglicher Forschungen nach neuen Leitstrukturen oder aktiven Verbindungen steht dabei zunächst ein Extrakt aus Pflanzen oder Mikroorganismen mit einer Vielzahl an Bestandteilen. Mit der Entwicklung neuer Analysemethoden, wie LC – DAD, – MS, – NMR stehen neue Möglichkeiten zur Charakterisierung des Metabolitenprofils in biologischen Extrakten zur Verfügung (Wolfender et al., 2000). Zur Charakterisierung des Substanzspektrums eines Extraktes gehört aber im Hinblick zur Auffindung pharmakologisch aktiver Strukturen auch die Identifizierung des aktiven Prinzips in komplexen Gemischen. Hier liegt in vielen Fällen die eigentliche Problematik der Naturstoffforschung, da aktive

Naturstoffe oftmals Minorkomponenten darstellen, was ihre Identifizierung nicht gerade einfach gestaltet.

Die ursprüngliche „klassische“ Vorgehensweise ausgehend vom Extrakt zur pharmakologisch aktiven Reinsubstanz stellt einen langen und kostenintensiven Prozess dar (Hamburger und Hostettmann, 1991). Er beinhaltet eine Vielzahl von aufeinanderfolgenden Schritten präparativer Chromatographie und Testung jeder einzelnen Fraktion auf Bioaktivität. Obwohl diese Vorgehensweise zur Isolierung und Identifizierung einer großen Zahl aktiver Moleküle geführt hat, wird sie zunehmend, auch aufgrund der hohen Kosten und der Möglichkeit des Aktivitätsverlustes während des langandauernden Aufreinigungsprozesses, von anderen Methoden abgelöst.

Zu diesen gehört z. B. die Bioautographie. Diese Methode war der erste und erfolgreiche Versuch chemoanalytische und biologische Assayprinzipien miteinander zu kombinieren. Frühe Bioautographiemethoden für die Dünnschichtchromatographie wurden bereits in den 1970er Jahren entwickelt (Homans und Fuchs, 1970). In diesem Verfahren wird ein Mikroorganismus, ein Enzym oder ein anderes biologisch aktives Molekül auf eine entwickelte DC – Platte aufgebracht. Nach einer geeigneten Inkubationsphase werden bioaktive Zonen entweder direkt sichtbar oder nach einem Detektionsschritt mit chromogenen Substraten visualisiert. Dank der relativen Einfachheit der meisten Assays und der Möglichkeit der parallelen Detektion mit verschiedenen Reagenzien hat dieses Verfahren großes Interesse gefunden.

Die neuesten methodischen Ansätze zur Auffindung von pharmakologisch interessanten Strukturen sind die Entwicklung und Anwendung von online – Assays, Biosensoren, Affinitätstrennungen und „functional genomics“ (Hamburger, 2003).

Eine vom klassischen Prinzip der aktivitätsbezogenen Isolierung abgeleitete Methode ist das HPLC – basierte Auffinden biologisch aktiver Naturstoffe. Diese Möglichkeit wurde zunächst in einem industriellen „high – throughput screening“ (HTS) realisiert (Zhou und Hamburger, 1996) und ähnliche Ansätze später auch in die wissenschaftliche Forschung eingeführt und entsprechend abgeändert (Cordell und Shin, 1999; Danz et al., 2001; Hamburger et al., 2002). Das Prinzip dieses Verfahrens lässt sich relativ einfach verwirklichen: Der zu analysierende Extrakt wird in μg – Mengen über eine analytische HPLC – Trennsäule in seine einzelnen Komponenten aufgetrennt. Mit Hilfe eines T – Split wird ein Teil des Eluates für die Bioassays mikrofractioniert (peak – oder zeitbezogen) und der andere Teil zur online spektroskopischen Charakterisierung des chromatographischen Fingerprints verwendet. Somit kann die biologische Aktivität nach Testung der Mikrofraktionen direkt mit dem

Chromatogramm und den dazugehörigen Spektren korreliert werden. Bei bereits bekannten Strukturen kann durch Datenbankrecherchen eine Identifizierung erfolgen und für unbekannte Verbindungen lassen sich erste strukturelle Aussagen ableiten. Erst wenn die Bioaktivität auf diese Weise einer interessanten Substanz zuzuordnen ist, erfolgt eine präparative Aufreinigung zur umfassenden Charakterisierung.

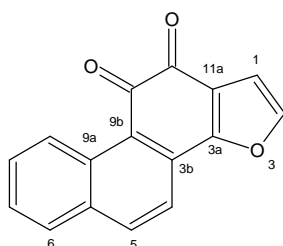
1.6. *Salvia miltiorrhiza* Bunge

Systematik und Definition

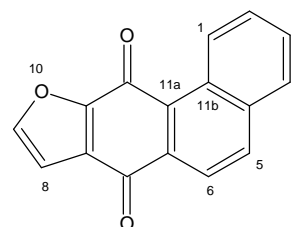
Salvia miltiorrhiza Bunge (Lamiaceae), der in China und Japan vorkommende Rotwurzelsalbei, ist eine mehrjährige, bis zu 80 cm hohe krautige Pflanze aus der Familie der Lamiaceae. Anwendung als Arzneidroge in der traditionellen chinesischen Medizin findet *Salviae miltiorrhizae radix* (chinesisch: Danshen), wobei es sich hier um das getrocknete Rhizom und die getrocknete Wurzel handelt (Hagers Handbuch, 2002).

Inhaltsstoffe

Hauptinhaltsstoffe von *Salviae miltiorrhizae radix* sind Diterpene („Tanshinone“) vom Phenanthrofurachinon – Typ. Diese werden je nach Stellung des Furanringes in zwei Serien klassifiziert: die Phenanthro[1,2-*b*]furan-10,11-dione und die Phenanthro[3,2-*b*]furan-10,11-dione.

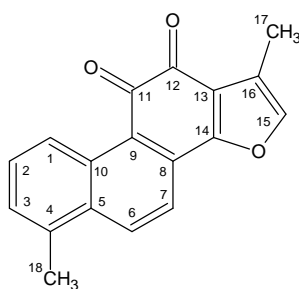


Phenanthro[1,2-*b*]furan-10,11-dion

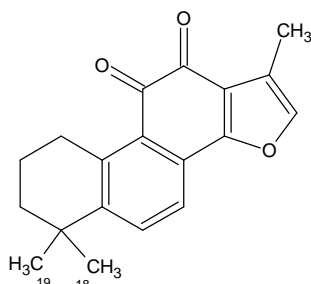


Phenanthro[3,2-*b*]furan-10,11-dion

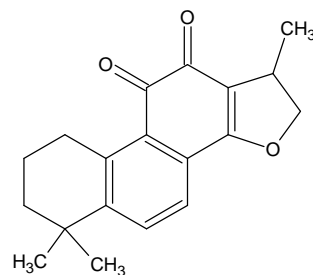
Die Tanshinone I und II, Cryptotanshinon und die Tanshindiole gehören zu den Phenanthro[1,2-*b*]furan-10,11-dionen, während die Isotanshinone Derivate der Phenanthro[3,2-*b*]furan-10,11-dione sind.



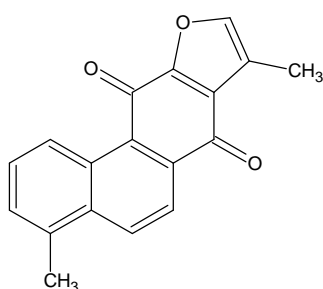
Tanshinon I



Tanshinon II

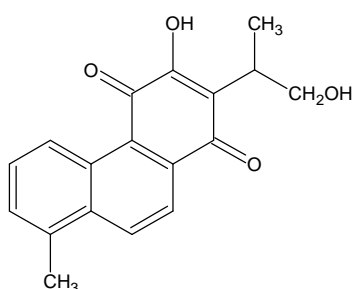


Cryptotanshinon

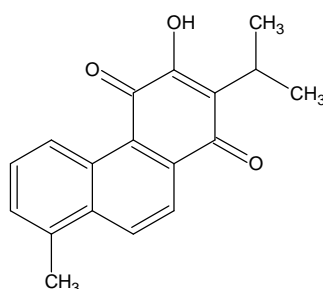


Isotanshinon I

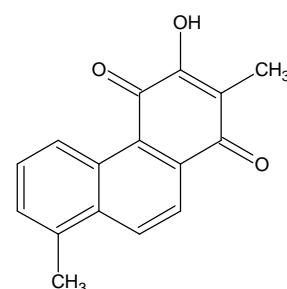
In geringen Mengen sind Verbindungen mit einer vom Phenanthren abgeleiteten Struktur ohne Furanring zum Beispiel die Danshenxinkune A – C vorhanden.



Danshenxinkun A



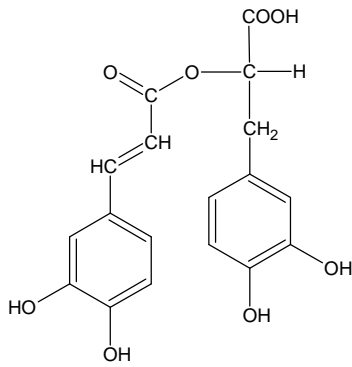
Danshenxinkun B



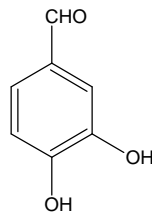
Danshenxinkun C

Des weiteren sind Diterpen – Derivate mit leicht abweichendem Aufbau isoliert worden, so dass bis zum jetzigen Zeitpunkt insgesamt weit mehr als 50 derartige Verbindungen in *S. miltiorrhiza* und anderen *Salvia* Spezies identifiziert werden konnten (Tang und Eisenbrand, 1992).

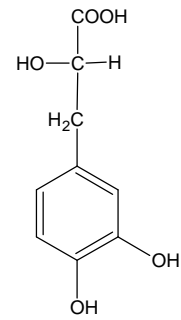
Neben den vorrangig lipidlöslichen Tanshinonen, findet man wasserlösliche Phenole. Die wichtigsten Moleküle sind: Rosmarinsäure (Ai und Li, 1988; Kohda et al., 1989), Protocatechualdehyd, 3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure und die Salvianolsäuren A – G (Tang und Eisenbrand, 1992; Ai und Li, 1991; Ai und Li, 1992; Ai und Li, 1996).



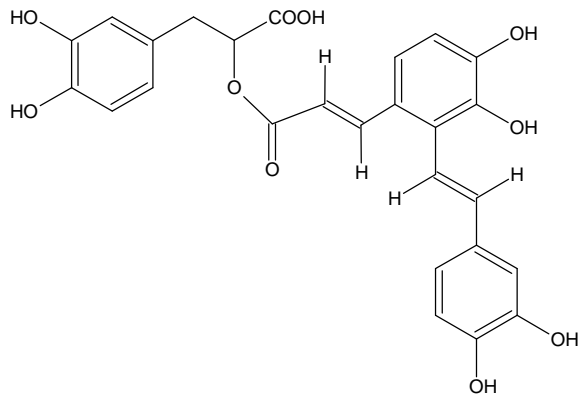
Rosmarinsäure



Protocatechualdehyd



3,4-Dihydroxyphenylmilchsäure



Salvianolsäure A

Pharmakologische Wirkungen und therapeutischer Einsatz

Danshen (*Salviae miltiorrhizae radix*) ist eine im Chinesischen Arzneibuch gelistete Arzneidroge, welche volksmedizinisch zur Behandlung von „Bluterkrankungen“ eingesetzt wurde. Die offiziellen Indikationen für die Droge sind die Therapie von Blut- und Herz-Kreislauf-erkrankungen (Angina pectoris, Thrombophlebitis, Gerinnungsstörungen), Schlaflosigkeit, Nervenschwäche und die Linderung von Entzündungsreaktionen (Tang und Eisenbrand, 1992; Huang, 1999). Andere Anwendungen sind die Behandlung von Hepatitis, Infektionen nach chirurgischen Eingriffen, Mastitis, Wundrose (Hautinfektion durch Streptokokken), Mittelohrentzündung, Mandelentzündung und Knochenmarkinfektionen (Huang, 1999).

Hinsichtlich der wirksamen Bestandteile unterscheidet man ebenfalls die lipidlöslichen Tanshinone von den wasserlöslichen Phenolen.

Die Tanshinone zeigen eine Vielzahl von biologischen Aktivitäten, eingeschlossen Effekte auf die Herzfunktionen (Zhou und Ruigrok, 1990; Takeo et al., 1990; Zhou et al., 1999), antioxidative Eigenschaften (Weng und Gordon, 1992; Ng et al. 2000), Aldose – Reduktase – Hemmaktivität (Tezuka et al., 1997), Interaktionen mit dem Benzodiazepinrezeptor (Lee et al., 1991; Chang et al., 1991), Zytotoxizität gegenüber menschlichen Krebszelllinien (Wu et al., 1991; Ryu et al., 1997), Apoptose – Induktion (Yoon et al., 1999; Sung et al., 1999), Hemmung der Blutplättchenaggregation (Lee et al., 1987) und antibakterielle Eigenschaften gegen eine Vielzahl von Mikroorganismen, z. B. Staphylokokken, *Escherichia coli*, Dysenterie – und Thyphusbakterien (Huang, 1999).

Die pharmakologischen Eigenschaften der phenolischen Verbindungen sind in den letzten Jahren ebenfalls intensiv untersucht worden (Liu et al., 1992; Wu et al., 1998). Verschiedene isolierte phenolische Moleküle weisen stark protektive Wirkungen gegenüber peroxidativem Schaden in Lebermikrosomen, Hepatozyten und Erythrozyten auf (Liu et al., 1992). Die Lithospermsäure B zeigt einen vom Endothelium abhängigen vasodilatorischen und hypotensiven Effekt (Kamata et al., 1993; Kamata et al., 1994), während dem Magnesiumsalz der Lithospermsäure B präventive Effekte gegenüber Urämie und Hepatitis sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Experimenten nachgewiesen werden konnte (Tanaka et al., 1989; Hase et al., 1997). In letzter Zeit erschienen Arbeiten, in denen anti HIV – Aktivitäten der Rosmarinsäure postuliert wurden (Lim et al., 1997; Arda et al., 1997; Mazumder et al., 1997).

Auch hinsichtlich Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS), eingeschlossen Morbus Alzheimer, zeigte *Salvia miltiorrhiza* eine Vielzahl pharmakologischer Aktivitäten, die maßgeblich im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen stehen. *Salvia miltiorrhiza* wird zur Behandlung von Hirngefäßerkrankungen angewandt und es existieren einige Studien zur Erforschung des möglichen Mechanismus des protektiven Effektes von *Salvia* gegenüber zerebraler Ischämie.

So wird vermutet, dass Danshen Funktionsstörungen des vasoaktiven intestinalen Peptids (VIP) herabsetzen kann (Kuang et al., 1989). VIP ist ein zwischen Gastrointestinaltrakt und ZNS verteiltes Neuropeptid, welches an Veränderungen, die bei zerebraler Ischämie auftreten, beteiligt ist. Verteilungsstörungen des Neuropeptides Substanz P sind ebenfalls mit einigen ZNS – Erkrankungen, die Alzheimer – Demenz eingeschlossen, assoziiert. Ansteigende Level der Substanz P lassen sich als Resultat neuronaler Schäden infolge zerebraler Ischämie deuten. Danshen soll nun eine schützende Wirkung der Neuronen gegenüber zerebraler Ischämie aufweisen (Kuang et al., 1991) und so möglicherweise aktiv einen Schutz auch gegenüber anderen ZNS – Erkrankungen über diesen Mechanismus bewirken.

Hinsichtlich zerebraler Ischämie sind weitere günstige Effekte der Droge untersucht worden. So kann *Salvia* durch Blockierung der präsynaptischen Glutamat – Freisetzung, den neuronalen Zelltod hemmen (Kuang und Xiang, 1994). Auch erklärt die Hemmung der NO – Bildung eventuell den bei *Salvia* beobachteten ZNS – protektiven Effekt (Kuang et al., 1996 a), da Stickstoffmonoxid mit anderen Metaboliten, z. B. Superoxidanion, unter Bildung von neurotoxischen Verbindungen reagieren kann (Beckman et al., 1990). Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Droge eventuell ischämische Zellveränderungen durch Anpassung von Somatostatin, einem weiteren Neuropeptid, welches in Lern- und Gedächtnisprozesse involviert ist, modifizieren kann (Kuang et al., 1993).

Die Reperfusion nach einer Ischämie kann ebenfalls zu Hirnschädigungen führen. Es wird angenommen, dass während der Reperfusion der Metabolismus freier Fettsäuren aus dem Abbau von Lipidmembranen in der Ischämiephase zur Bildung freier Sauerstoffradikale führt, die ihrerseits zu einer fortschreitenden Hirnschädigung beitragen (Traystman et al., 1991). *Salviae miltiorrhizae radix* zeigte hinsichtlich dieser Problematik einen schützenden Effekt durch Reduzierung der Lipidperoxidation (Kuang et al., 1996b; Liu et al., 1992; Zhao et al., 1996).

Die Wurzeldroge stellt demnach eine Möglichkeit als ergänzender therapeutischer Ansatz zur Behandlung des Schlaganfalls und der Ischämie dar.

Auch die antioxidativen Effekte von *Salvia* sind sowohl in vitro als auch in Tiermodellen intensiv untersucht und verschiedene Verbindungen mit signifikanten antioxidativen Eigenschaften isoliert und identifiziert worden (Wenig und Gordon, 1992; Zhang et al., 1990). Zu diesen Verbindungen gehören neben einigen Tanshinonen auch die Salvianolsäuren A und B (Du et al., 2000; Guanhua und Juntian, 1997), Rosmarinquinon (Miltiron) und andere phenolische Strukturen (Huang und Zang, 1992; Kang et al., 1997; Liu et al., 1992; Weng und Gordon, 1992). Solche antioxidativ wirksamen Substanzen könnten in der Alzheimer – Therapie ebenfalls von Nutzen sein.

Die vielfältigen pharmakologischen Eigenschaften, die sowohl Ergebnisse von *in vitro* als auch *in vivo* Tests sind, werfen die Frage nach der Toxizität der Droge auf. Danshen kann als relativ ungiftig bezeichnet werden. Die LD₅₀ (Maus) des Extraktes beträgt $80,5 \pm 3,1$ g/kg (i.p.) (Huang, 1999).

Die Vielzahl der pharmakologischen Aktivitäten und die geringe Toxizität, machen die Wurzeldroge damit zu einem sehr interessanten Forschungsobjekt, was sich auch in der Zahl der Publikationen niederschlägt. Insbesondere die Eigenschaften hinsichtlich neurodegenerativer Erkrankungen sind in Anbetracht der demographischen Bevölkerungsentwicklung und dem damit verbundenen Anstieg von ZNS – Erkrankungen des Alters (z. B. Alzheimer – Demenz) von wichtiger Bedeutung.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien der chemischen und biologischen Verfahren

2.1.1. Allgemeine Laborgeräte

Analysenwaage:	BP 210 S und MC 210 P (Sartorius, Göttingen)
Autoklav:	Varioklav Dampfsterilisator (H + P Labortechnik, Oberschleißheim)
Eindampfen / Trocknen:	Rotationsverdampfer VV 200 mit Pumpensystem Rotavac control (Heidolph Instruments, Kelheim) SC 210A Sped Vac Plus (Savant Instruments, Holbrook/NY, USA) Evaporator Zentrifuge RC 10.22, Kühlfalle RCT 60 (Jouan, Saint Herblain, Frankreich)
Extraktion:	ASE: ASE 200 mit Solvent Controller (Dionex, Sunnyvale, USA) SFE: SFX 220 mit SFX 200 Controller, 100 DX Syringe Pump (Isco Inc., Lincoln, USA)
Fermentation:	Rührkessel – Bioreaktor Biostat ED 10 (B. Braun Biotech International, Melsungen)
Heizplatte:	Thermoplate S (Desaga, Heidelberg)
Heizblock:	QBTP (Grant, Cambridge, UK)
Homogenisator:	EmulsiFlex-C5 Homogenisator (Avestin, Ottawa, Kanada)
Lyophilisation:	Alpha 2-4 (Heraeus – Christ, Osterode) Freezemobile 12 XL (VirTis, Gardiner, USA)
MTP – Reader:	FLUOStar Galaxy (BMG Labtechnologies, Offenburg) HTS 7000 BioAssayReader (Perkin Elmer, Überlingen)
PCR – Gerät:	Primus 25 (MWG, Mendenhall, USA)
Schüttelmaschinen:	Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg) Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg) Titramax 100 (Heidolph, Kehlheim)

Sterile Werkbank:	CA/REV 4-Sicherheitswerkbank, Klasse II (Clean Air, Hilden)
Stromversorgungsgerät	
für Gelelektrophorese:	PowerEase [®] 500 (invitrogen [™] , Karlsruhe)
Ultraschallbad:	Sonorex RK 100 (Bandelin Electronic, Berlin)
Ultraschallsonde:	Labsonic U (B. Braun, Melsungen)
Wasseraufbereitungssystem:	Milli – Q RG (Millipore, Schwalbach) Sersdest SD 2800 (Seral, Ransbach – Baumbach)
Zentrifugen:	Labofuge 400R (Heraeus Instruments, Hanau) Universal 30RF (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) L7-35 Ultrazentrifuge (Beckman, München) J2-MC (Beckman, München)

2.1.2. Chromatographische und spektroskopische Geräte

HPLC – Anlagen:	HP 1050: quartäre Pumpe, HP 1040 M II DAD – Detektor, Workstation (Hewlett Packard, Palo Alto, USA) HP 1100: Degasser, binäre Pumpe, Autosampler, Säulenofen, DAD – Detektor, HP Workstation (Hewlett Packard, Palo Alto, USA)
Präparative HPLC - Anlage:	Wellchrom HPLC Pumpe K – 1001 (Knauer, Berlin), Detektor LKB Uvicord SII, Fraktionssammler LKB SuperFrac (beide Pharmacia, Freiburg)
LPLC:	Pumpe (Pharmatech Research Corporation, Baltimore, USA), Detektor LKB Uvicord SII, Fraktionssammler LKB SuperFrac (beide Pharmacia, Freiburg)
Massenspektrometer:	ESI MS/APCIMS: API 165 single quadrupole instruments (Applied Biosystems, Darmstadt)
NMR – Spektrometer:	DRX 400 (Bruker, Fällanden, Schweiz)
Gelchromatographie – Anlage:	LKB Pump P1, Detektor LKB Uvicord SII, Fraktionssammler LKB SuperFrac, Schreiber LKB REC 2 (alle Pharmacia, Freiburg)
UV/Vis Photometer:	DU640 Spektrometer (Beckman, Carlsbad, USA)

2.1.3. Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel der analytischen und chemischen Verfahren waren in der Regel p. A. – Qualität und wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Laborchemie (Apolda) oder Merck (Darmstadt) bezogen. Für HPLC und Gelchromatographie wurden Lösungsmittel mit HPLC – Reinheit von Merck (Darmstadt) verwendet. Für die NMR – Untersuchungen wurden die Substanzen gelöst in Chloroform D von Euriso – Top (Gif – Sur – Yvette, Frankreich) vermessen.

Die Lösungsmittel, sowie die Chemikalien und Reagenzien der Bioassays waren für biochemische Zwecke geeignete Materialien höchster Reinheit.

Das Wasser wurde von den angegeben Wasseraufbereitungsanlagen gewonnen.

2.1.4. Chemikalien, Puffer und Reagenzien

Albumin Standard	PIERCE Biotechnology (Rockford, USA)
Ammoniumacetat	Fluka (Taufkirchen)
Ammoniumsulfat	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
Aprotinin	Fluka (Taufkirchen)
Bicine	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
CaCl ₂	Roth (Karlsruhe)
Clorgylinhydrochlorid	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
Coomassie® Brillantblau G 250	Merck (Darmstadt)
Coomassie® Reagenz	PIERCE Biotechnology, Inc., (Rockford, USA)
R-(-)-Deprenylhydrochlorid	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
EDTA	Merck (Darmstadt)
Ethylenglycol	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
Galactose	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
Glutathion	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
Glycerol	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
Glycin	Merck (Darmstadt)
Harman	Fluka (Taufkirchen)
Kynuramindihydrobromid	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
Leupeptin hemisulfat	Fluka (Taufkirchen)

MES	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
NaOH	Merck (Darmstadt)
NuPAGE®	
Sample Reducing Agent (10 x)	invitrogen™ (Karlsruhe)
NuPAGE®	
LDS Sample Buffer (4 x)	invitrogen™ (Karlsruhe)
PEG 1000	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
PBS	Biochrom (Berlin)
SDS	Merck (Darmstadt)
Sorbitol	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck (Darmstadt)
Triton® X 100	Merck (Darmstadt)
Vanillin	Sigma – Aldrich (Taufkirchen)
Coomassie – Entfärbelösung	5 % Methanol, 5 % Essigsäure
Coomassie – Färbelösung	45 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,2 % Coomassie Brillantblau G250 (w/v)
Extracti-Gel® D	PIERCE Biotechnology (Rockford, USA)
Glutathion Sepharose™ 4B	Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden)
Glutathion/Tris HCl/NaCl – Puffer	100 mM Tris HCl pH 8 / 20 mM Glutathion / 120 mM NaCl
Lösung A (für Transformation)	30 g/l Ethylenglycol / 10 mM Bicine / 1 M Sorbitol, pH 8,35
Lösung B (für Transformation)	40 g/100 ml PEG 1000 / 200 mM Bicine, pH 8,35
Lösung C (für Transformation)	150 mM NaCl / 10 mM Bicine, pH 8,35
MES SDS – Puffer pH 7,3	50 mM MES pH 7,2 / 50 mM Tris / 1 mM EDTA / 0,1 % SDS
NaOH/SDS – Lösung	0,1 N NaOH / 1% SDS
Sörensen – Phosphatpuffer pH 7,6	0,2 M KH ₂ PO ₄ , pH – Wert – Einstellung mit NaOH
TAE – Puffer pH 8,5	40 mM Tris / 1 mM EDTA / 20 mM Eisessig
Tris/EDTA/Glucose – Lösung	25 mM Tris / 1 mM EDTA / 1 % Glucose
Tris HCl/EDTA – Puffer	10 mM Tris HCl pH 7,4 / 1 mM EDTA

2.1.5. Drogenmaterial

Salviae miltiorrhizae radix wurde vom Institut für Chinesische Medizin, Chinesische Heilkräuter (Bochum) bezogen. Angelikawurzel und Kamillenblüten stammen von der Firma Caesar & Loretz GmbH (Hilden).

2.1.6. Ratten

Zur Gewinnung von MAO A und B wurde frische Leber von Ratten des Stammes Schö : WIST verwendet. Die Leber wurde, nachdem die Ratten mit einer Überdosis CO₂ betäubt worden waren, entnommen und sofort in eisgekühlten Sörensen – Phosphatpuffer überführt und weiter verarbeitet.

2.1.7. Medien

Die Medienbestandteile wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma – Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

Escherichia coli

LB – Medium	Trypton	10 g/l
	Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	10 g/l

Saccharomyces cerevisiae

YPD	Bacto Pepton	20 g/l
	Hefeextrakt	10 g/l
	Glucose	20 g/l
Minimalmedium mit Glucose	Glucose	2 g/l
	Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren)	6,7 g/l
	L – Tryptophan	20 mg/l
	L – Histidin	20 mg/l
	L – Leucin	30 mg/l

Minimalmedium mit Galactose	Galactose	30 g/l
	Yeast Nitrogen Base	6,7 g/l
	(ohne Aminosäuren)	
	L – Tryptophan	20 mg/l
	L – Histidin	20 mg/l
	L – Leucin	30 mg/l
Fermentationsmedium	Yeast Nitrogen Base	6,7 g/l
	(ohne Aminosäuren)	
	Adenin	10 mg/l
	L – Arginin	50 mg/l
	L – Asparaginsäure	80 mg/l
	L – Histidin	20 mg/l
	L – Isoleucin	50 mg/l
	L – Leucin	100 mg/l
	L – Lysin	50 mg/l
	L – Methionin	20 mg/l
	L – Phenylalanin	50 mg/l
	L – Threonin	100 mg/l
	L – Tryptophan	50 mg/l
	L – Tyrosin	50 mg/l
	Valin	140 mg/l

2.1.8. Mikroorganismen – Stämme

<u>Stämme</u>	<u>Merkmale</u>	<u>Herkunft/Referenz</u>
<i>Escherichia coli</i> DH5a	deoR, endA1, gyrA96, HsdR17(r _k ⁻ m _k ⁺), recA1, relA1, supE44, thi-1, ? (lacZYA-argFV169), F 80dlacZ? M15, F ⁻ , ? ⁻	Clontech (Heidelberg) (Dower, 1990; Hanahan, 1983)

<i>Escherichia coli</i> TG 1	F ['] traD36 lacI ^q x(lacZ) M15 proA ⁺ B ⁺ /supEx(hsdM- mcrB)5(r _k ⁻ m _k ⁻ McrB ⁻) thix (lac-proAB)	BIOLABS (Beverly, USA) (Maniatis et al. 1982)
------------------------------	--	---

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CEN-PK2	MATa/MATa, ura3-52/ura 3-52, trp1-289/trp1-289, leu2-3/leu2-3, 112, his3-1/his3- 1, MAL2-8 ^c /MAL2-8 ^c SUC2/SUC2	Entian, K. D. Universität Frankfurt
--	--	--

2.1.9. Vektoren

<u>Vektor</u>	<u>Merkmale</u>	<u>Herkunft/Referenz</u>
pEG-KT	Pcyc, 2μ, amp ^r , GST, URA3, LEU2-d	Funk, M., Marburg (Mitchel et al. 1993)
HM 11(in pUC) (67740)	amp ^r	ATCC (Manassas, USA) (Breakfield X., Hsu Y. P., 1991; Hsu et al., 1988)

2.1.10. Enzyme

Thrombin Protease	Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden)
Restriktionsendonukleasen	Fermentas (St. Leon-Rot)

2.1.11. Primer für PCR und Sequenzierung

Die Primer für die PCR und Sequenzierung wurden von der Firma MWG – Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert.

PCR:

MAOA-5-1 GCT CTA GAT AGG CAC AGG AGT GG

XbaI

MAOA-3-1 ACG CGT CGA CGG CCC AAT GAC ACA G

Sall

Sequenzierung:

MAO S 5' rev ACGAGACGCTCACTGACATT

MAO S 3' rev GGCCCAATGACACAGCCTT

2.2. Rattenleberpräparation – Gewinnung von MAO A und B

Die Gewinnung der beiden Isoenzyme MAO A und B aus Rattenleberhomogenaten erfolgte als partielle Aufreinigung nach Anleitung von Holt et al. (1997).

Alle Arbeiten wurden bei 4 °C durchgeführt. Zunächst wurde eine frische Leber (ca. 10 g) mit einem Messer grob zerteilt und portionsweise mit der 20-fachen Menge einer 0,2 M Saccharoselösung versetzt, in einem Mixer weiter zerkleinert und anschließend in einem Wheaton – Homogenisator bearbeitet. Die so gewonnene Suspension wurde zentrifugiert (4 °C, 1000 g, 10 min), der Überstand in neue Zentrifugengläser überführt und erneut zentrifugiert (4 °C, 10000 g, 30 min). Der erhaltene Überstand wurde vorsichtig abdekantiert und verworfen. Das Pellet wurde in 4 ml 0,3 M Saccharoselösung aufgenommen. 40 ml einer 1,2 M Saccharoselösung wurden in ein Ultrazentrifugenglas pipetiert und anschließend mit der Pelletsuspension vorsichtig überschichtet. Die Probe wurde ultrazentrifugiert (4 °C, 53000 g, 120 min), der Überstand vorsichtig abgegossen und das Pellet in 40 ml Sörensen – Phosphatpuffer aufgenommen und nochmals ultrazentrifugiert (4 °C, 53000 g, 90 min). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 40 ml Sörensen – Phosphatpuffer aufgenommen und in einem Wheaton – Homogenisator resuspendiert. Von der auf diese Weise gewonnenen Mitochondrienfraktion wurde mittels der Methode nach Bradford (1976) die Proteinkonzentration photometrisch ermittelt. Die Mitochondriensuspension wurde bei –32 °C gelagert.

2.3. Durchführung des Monoaminoxidase – Test I

Die Mitochondriensuspension wurde durch Verdünnen mit Phosphatpuffer auf eine Proteinkonzentration von 0,2 mg/ml eingestellt und zur Reduktion der Partikelgröße unter Eiskühlung 30 Sekunden mit einer Ultraschallsonde behandelt.

Zur Bestimmung der Hemmung von MAO A und B wurden 500 µl des Homogenats mit 5 µl der in DMSO gelösten Extrakte oder Reinsubstanzen verschiedener Konzentrationen versetzt. Die Proben wurden unter Schütteln bei 37 °C für 20 Minuten inkubiert. Ebenfalls inkubiert wurden Proben, die 5 µl DMSO oder 5 µl Phosphatpuffer enthielten. Diese Proben dienten als Kontrollen.

Zur Ermittlung der selektiven Hemmung von MAO A oder B wurden 500 µl des Homogenats mit 5 µl 50 µM Clorgylin (MAO A – Hemmer) oder 5 µl 50 µM Deprenyl (MAO B – Hemmer) unter Schütteln bei 37 °C über 10 Minuten vorinkubiert. Anschließend wurden 5 µl der in DMSO gelösten Extrakte oder Reinsubstanzen zupipetiert und erneut unter Schütteln bei 37 °C über 10 Minuten inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation wurden pro Well einer 96 – Well – MTP 50 µl der inkubierten Probe und 100 µM Kynuramindihydrobromid (Substrat für MAO A und MAO B) gemischt (Dreifachbestimmung). Nach kurzem Schütteln wurde die Absorptionsmessung bei 360 nm und 37 °C durchgeführt. Die Messwertaufzeichnung erfolgte alle 3 min über einen Zeitraum von 60 Minuten.

Zur Auswertung und Bestimmung der Enzymaktivität bzw. Enzymhemmung wurden bei linearem Substratumsatz die Anstiege $\Delta E/\Delta t$ der einzelnen Proben, als Maß für die Enzymaktivität, berechnet. Die durchschnittlichen $\Delta E/\Delta t$ -Werte der Testextrakte oder Testsubstanzen (x % MAO – Aktivität) wurden, unter Vernachlässigung des negativen Vorzeichens, relativ zum Anstieg der DMSO – Negativkontrolle (100 % MAO – Aktivität) kalkuliert und als Hemmaktivität (x % - MAO – Hemmung) ausgedrückt.

Zur Bestimmung der selektiven Hemmung von MAO A oder B wurden als 100 % - Werte die Proben verwendet, die DMSO und Clorgylin (für 100 % MAO B) bzw. DMSO und Deprenyl (für 100 % MAO A) enthielten.

2.4. Anzucht der Mikroorganismen

Die *E. coli* – Stämme wurden für die Klonierung in LB – Medium bei 37 °C angezogen. Die Medien enthielten zusätzlich 100 µg/ml Ampicillin als Selektionsdruck und gegebenenfalls, zur Kultivierung in Petrischalen, 1,5 % (w/v) Agar.

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* zur Herstellung kompetenter Zellen erfolgte in YPD – Medium bei 30 °C. Plasmid – tragende Klone von *S. cerevisiae* wurden bei 30 °C in Minimalmedium mit Glucose unter Schütteln bis zur maximalen Zelldichte angezogen und anschließend zur Induktion der Bildung des GST – Fusionsproteins weiter bis zur Verdopplung der Zelldichte bei 30 °C in Minimalmedium mit Galactose kultiviert. Zur Gewinnung größerer Mengen an Biomasse erfolgte eine Fermentation (siehe Kap. 2.7.).

Stammkulturen der Mikroorganismen wurden in Glycerin bei –70 °C aufbewahrt.

2.5. Methoden zur Klonierung von MAO A

2.5.1. Isolierung von Plasmid – DNA

Die Plasmid – DNA aus *E. coli* wurde unter Verwendung von QIAFilter™ Plasmid Midi Kit der Firma QIAGEN (Hilden) nach Vorschrift isoliert.

Isolierungen in kleinem Umfang wurden nach folgendem Schema durchgeführt (Birnboim und Doly, 1979):

Die Bakterienzellen wurden, nach Abtrennen des Kulturmediums und Aufnahme des Pellets in 400 µl Tris/EDTA/Glucose – Lösung, mit 800 µl NaOH/SDS einer alkalischen Lyse unterzogen und die Proteine mit 600 µl einer 3 M Natriumacetat – Lösung ausgefällt und abgetrennt. Anschließend wurden im Überstand die Nukleinsäuren mit 0,6 Volumen Isopropanol präzipitiert. Das nach Zentrifugation erhaltene Pellet wurde in 200 µl Wasser gelöst und die DNA von RNA durch Fällung der RNA mit 200 µl 9 M Lithiumchlorid – Lösung getrennt. Die DNA wurde aus dem Überstand, nach Überführen in ein neues Gefäß, durch Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 25 µl Wasser aufgenommen.

2.5.2. Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation von Plasmid – DNA erfolgte in Ansätzen von 25 µl. Als Template wurde das gereinigte Plasmid HM11 in Mengen von 10 ng pro Ansatz eingesetzt. Von den beiden Primern MAOA-5-1 und MAOA-3-1 wurden je 50 pmol pro Ansatz verwendet. Im Einzelnen setzten sich die Ansätze wie folgt zusammen:

25 µl – Ansatz	1,5 U taqPolymerase
	10 mM Tris HCl
	50 mM KCl
	1,5 mM MgCl ₂
	200 µM dNTP (pro Nucleotid)

Die Durchführung der Reaktionen erfolgte in einem Thermo – Cycler nach folgendem

Programm:	3 min 96 °C	1 x zu Beginn
	30 sec 96 °C, 60 sec 55 °C, 90 sec 72 °C	25 Zyklen
	15 min 72 °C	

Die DNA wurde im Anschluss mittels Agarose – Gelelektrophorese von den Primern getrennt, die Bande ausgeschnitten und mit einem Gel – Extraktions – Kit (QIAquick®, QIAGEN) aufgereinigt.

2.5.3. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktionen vom PCR – Produkt (MAO A – PCR) und aufgereinigtem pEG–KT mit den Restriktionsendonukleasen *SalI* und *XbaI* erfolgte in 50 µl – Ansätzen im dazugehörigen Puffersystem über 2 Stunden bei 37 °C. Es wurden 10 Units des jeweiligen Enzyms und 1 µg MAO A – PCR bzw. 0,5 µg pEG–KT miteinander zur Reaktion gebracht.

Die Reaktionsansätze wurden anschließend über den QIAquick® Nucleotid Removal Kit aufgereinigt.

2.5.4. Ligation

Die Ligation vom Insert (aus Verdau MAO A – PCR) und Vektor (aus Verdau pEG–KT) wurde in 20 µl – Ansätzen unter Zugabe von 1 Unit T4 DNA Ligase in dem dazugehörigen Ligationspuffer (invitrogenTM, Karlsruhe) über 2 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die zu legierenden DNA – Fragmente wurden im äquimolaren Verhältnis eingesetzt.

2.5.5. Transformationen

E. coli

Die Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli* DH5a erfolgte mit Hilfe der CaCl_2 – Methode (Mandel und Higa, 1970).

Die Bakterienzellen wurden bis zu einer OD_{600} von 0,59 bei 37 °C kultiviert, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 4 °C, 4000 g). Das Pellet wurde in 25 ml 0,1 M CaCl_2 – Lösung (eiskalt) resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (5 min, 4 °C, 4000 g). Der erhaltene Rückstand wurde in 2,5 ml 0,1 M CaCl_2 – Lösung (eiskalt) aufgenommen und 2,5 ml 50 % Glycerol zugesetzt. Die Aufbewahrung der so gewonnenen kompetenten Zellen erfolgte in 100 µl – Aliquots bei –70 °C.

Zur Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 10 µl des Ligationsansatzes (pEG–KT MAO A) vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 2 min auf 42 °C erhitzt, sofort wieder 2 min auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 1 ml LB – Medium 60 min bei 37 °C kultiviert. Nach Abzentrifugation des Kulturmediums (5 min, 4000 g) wurden die Zellen in 100 µl LB – Medium aufgenommen und auf eine LB – Agar – Platte mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

Von der Agar – Platte wurden einige Klone entnommen, das Plasmid mit QIAFilterTM Plasmid Midi Kit aufgereinigt und zur Prüfung einem Enzymverdau mit *Bam*HI, *Sal*I und *Xba*I unterzogen. Der Kontroll – Verdau erfolgte in 50 µl – Ansätzen im dazugehörigen Puffersystem über 2 Stunden bei 37 °C. Es wurden 0,5 ng pEG–KT MAO A und 10 Units *Bam*HI und 0,5 ng pEG–KT MAO A und 10 Units *Sal*I und 10 Units *Xba*I (Doppelverdau) verwendet. Die Auswertung erfolgte nach Auftrennung der DNA – Fragmente im Agarosegel im Vergleich zu einem Größenmarker.

S. cerevisiae

Die Transformation von *S. cerevisiae* – Zellen wurde nach der Methode von Klebe (1983) durchgeführt.

Die Hefezellen wurden auf YPD – Medium bei 30 °C bis zu einer OD_{600} von 0,65 kultiviert. Nach dem Zentrifugieren (5 min, 4000 g) wurde das Pellet in 50 ml Lösung A resuspendiert, erneut zentrifugiert (5 min, 4000 g), in 2 ml Lösung A aufgenommen und mit 110 µl DMSO gemischt. Die auf diese Weise gewonnenen kompetenten Zellen wurden in Form von 200 µl Aliquots bei –70 °C gelagert.

Zur Transformation wurden 200 µl gefrorene kompetente Zellen mit pEG–KT MAO A gemischt und 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zusatz von 1,5 ml Lösung B folgte eine Inkubation über 60 min bei 30 °C. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (3 min, 3000 g), in 1,5 ml Lösung C resuspendiert, erneut zentrifugiert (3 min, 3000 g) und in 200 µl Lösung C aufgenommen. Die transformierten Zellen wurden auf Minimalmedium mit Glucose (Selektionsmedium) ausplattiert und bei 30 °C über zwei bis drei Tage kultiviert.

2.6. DNA – Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid – DNA pEG–KT MAO A wurde von der Firma MWG – Biotech AG (Ebersberg) durchgeführt.

2.7. Fermentation von *S. cerevisiae*

Die Fermentation von transformierter *S. cerevisiae* wurde im Biostat ED 10 – Fermentor mit digitaler Kontrolleinheit (DCU) für Standardprozessregelungen und Micro – MFCS (Multi Fermentor Control System) zum Datenmanagement durchgeführt. Der Reaktor wurde bei einer Temperatur von 30 °C, einem Druck von 200 mbar, einem pH – Wert von 5, einer Belüftungsrate von 10 Liter/min und einer Drehzahl des Rührers von 311 U/min betrieben. Zusätzlich war der Fermentor mit einer Gasmischstation zur Erhöhung des Gelöst – Sauerstoffanteils in der Zuluft sowie den online Analysegeräten Uras 10E und Magnos 6G für CO₂ und O₂ im Abgas ausgerüstet. Die online – Messung und Regelung der Glucosekonzentration im Fermentor wurde mit einem bezüglich Signallaufzeiten optimierten System durchgeführt. Es bestand aus einem kontinuierlichen Probennahme – und Probenverdünnungssystem, einer zyklisch arbeitenden Fließinjektionsanalytik für Glucose, einem PC zur Messdatenfilterung und – Wandlung sowie einer Prozessregler – gesteuerten Glucosefeedingpumpe. Die Regelung des pH – Wertes erfolgte durch gesteuerte Zugabe von Ammoniumhydroxidlösung (12,5 %).

Die Fermentation gliederte sich in eine batch – Phase (Phase I), eine feed batch – Phase (Phase II) und eine Induktionsphase (Phase III).

Zunächst wurde eine Vorkultur der Hefe in 1 Liter Fermentationsmedium mit 2 % Glucose unter Schütteln bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ (Messung mit Utrospec 3100 pro, Amersham

Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) von 1,52 durchgeführt. Anschließend wurde die Kulturbrühe zu frischen Fermentationsmedium mit 1 % Glucose im Reaktor gegeben, so dass ein Gesamtvolumen von 6,5 Liter resultierte. In der folgenden batch – Phase von 10 Stunden wurde eine OD₆₀₀ von 4,84 erreicht. Anschließend erfolgte die feeding batch – Phase über einen Zeitraum von 9 Stunden, in der die OD₆₀₀ auf 8,84 erhöht werden konnte. In der III. Phase erfolgte die Induktion durch Zugabe von Galactose (3 %) und frischen Fermentationsmedium, so dass ein Endvolumen von 9 Litern resultierte. In der Induktionsphase von 48 Stunden erhöhte sich die OD₆₀₀ auf 21. Die Ernte der Hefezellen erfolgte nach einem Gesamtzeitraum von 67 Stunden. Die Kulturbrühe wurde durch Zentrifugation abgetrennt und die Zellen bei –70 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

2.8. Gewinnung des rekombinanten Enzyms MAO A aus *S. cerevisiae*

Alle Arbeiten wurden, sofern nicht anders angegeben, bei 4 °C bzw. unter Eiskühlung durchgeführt.

2.8.1. Zellaufschluss und Gewinnung der Mitochondrien

Die durch Fermentation gewonnenen Hefezellen wurden portionsweise (je ca. 70 g Feuchtmasse) nach Resuspension in einem Liter Tris HCl/EDTA – Puffer (unter Zusatz von 0,15 µM Aprotinin und 10 µM Leupeptin als Proteaseinhibitoren) mit Hilfe des EmulsiFlex – C5 Homogenisators bearbeitet. Der Prozess wurde jeweils zweimal wiederholt, um eine vollständige Freisetzung des Zellinneren zu erreichen.

Zur Abtrennung des Zellbruchs vom Zytosol wurde die Suspension zentrifugiert (4 °C, 1590 g, 15 min). Der Überstand wurde in Ultrazentrifugengläser überführt und zur Gewinnung der Mitochondrien portionsweise zentrifugiert (4 °C, 70000 g, 20 min). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets bei –70 °C gelagert.

2.8.2. Proteinisolierung aus den Mitochondrien

Die Hefezellmitochondrien (je ca. 3 g) wurden in Tris HCl/EDTA – Puffer (unter Zusatz von 0,15 µM Aprotinin und 10 µM Leupeptin als Proteaseinhibitoren) suspendiert (Endvolumen ca. 15 ml), mit Triton[®] X 100 (0,5 %, v/v) versetzt und über 30 Minuten in einem Wheaton –

Homogenisator mehrfach homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension ultrazentrifugiert (4 °C, 160000 g, 40 min), der Überstand abgenommen und auf Eis gelagert. Das Pellet wurde in Puffer (s.o.) aufgenommen (Endvolumen ca. 10 ml), erneut mit Triton® X 100 (0,5 %, v/v) versetzt und der Vorgang, wie oben beschrieben, wiederholt. Die beiden Überstände wurden anschließend vereinigt.

2.8.3. Ammoniumsulfat – Fällung

Der Triton – Extrakt wurde in ein Becherglas überführt und unter Rühren Ammoniumsulfat in kleinen Anteilen hinzugegeben (65 %, m/v). Der Ansatz wurde 60 Minuten rühren gelassen und anschließend zentrifugiert (4 °C, 4000 g, 30 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zur weiteren Isolierung verwendet.

2.8.4. Dialyse

Das Pellet der Ammoniumsulfatfällung wurde in Tris HCl/EDTA – Puffer (unter Zusatz von 0,15 µM Aprotinin und 10 µM Leupeptin als Proteaseinhibitoren) gelöst (Endvolumen ca. 20 ml) und in einen vorgewässerten Dialyseschlauch gefüllt. Die Dialyse wurde unter Rühren und mehrmaligen Wechseln des Puffers gegen Tris HCl/EDTA – Puffer durchgeführt.

Das Dialysat wurde entweder aliquotiert und bei –70 °C gelagert oder zur weiteren Aufreinigung des Fusionsproteins verwendet.

2.8.5. Glutathion – Sepharose™ 4B

Zur Abtrennung von MAO A als GST Fusionsprotein von anderen Proteinen wurde gemäß der Anleitung für die Glutathion – Sepharose™ 4B die Sepharose (1,5 ml Bettvolumen) in einem 50 ml Schraubdeckelgefäß zunächst mit 2 x 15 ml Tris HCl/EDTA – Puffer äquilibriert, das Dialysat aufgegeben und unter leichtem Schwenken bei 4 °C über 60 Minuten das Protein gebunden, die Matrix mit Tris HCl/EDTA – Puffer (je 15 ml) mehrfach gewaschen und das Fusionsprotein in drei Schritten mit je 1,5 ml Glutathion/Tris HCl/NaCl – Puffer eluiert. Die Eluate wurden bei –70 °C gelagert.

Die Zentrifugationen zur Trennung von Sepharose und Lösungen wurden bei 4 °C, 700 g über 5 min durchgeführt.

2.9. Charakterisierung des Enzyms im Dialysat

2.9.1. SDS – Polyacrylamid – Gelelektrophorese (SDS - Page)

Zur Darstellung der Proteingröße im Vergleich zu einem Größenmarker wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt (siehe Kap. 2.10.6.).

2.9.2. Bestimmung der kinetischen Daten

In einer 96 – Well – MTP (Dreifachbestimmung) wurden das Dialysat (Proteinkonzentration 0,05 mg/ml), und verschiedene Konzentrationen Kynuramindihydrobromid (31,25 μM – 250 μM), gelöst in Sörensen – Phosphatpuffer, gemischt und anschließend die Absorptionsmessung bei 360 nm durchgeführt. Die Messwertaufnahme erfolgte alle 60 Sekunden über einen Zeitraum von 10 Minuten bei 30 °C. Als Blankwert wurden Dialysat und Sörensen – Phosphatpuffer miteinander gemischt und vermessen.

Zur Auswertung wurde im Zeitraum zwischen 0 und 1 Minute die Extinktionsänderung des Blankwertes ($\Delta E_{\text{Blank}}/\text{min}$) von der Extinktionsänderung ($\Delta E/\text{min}$) der verschiedenen Substratkonzentrationen abgezogen. Die Berechnung der Geschwindigkeit (v) der enzymatischen Reaktion als Konzentrationsänderung (Δc) pro Zeitänderung (Δt) erfolgte nach:

$$v = \Delta c / \Delta t \quad \Delta c = \Delta E / e \cdot d$$

$$v = \Delta E / \Delta t \cdot e \cdot d \quad [\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$$

$$\Delta t = 1 [\text{min}]$$

$$e \text{ (molarer Extinktionskoeffizient)} = 4,122 [\text{l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$$

$$d \text{ (Schichtdicke)} = 0,6 [\text{cm}]$$

$$\text{bzw.} \quad v = \Delta E / 2,4732 \quad [\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$$

Zur Darstellung der Michaelis – Menten – Kinetik wurden die Substratkonzentrationen c [μM] als x – Werte gegen die Geschwindigkeiten v [$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] als y – Werte aufgetragen. Im Lineweaver – Burk – Plot wurden von beiden Größen die Reziprokwerte gegeneinander dargestellt und aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der x – Achse $-K_m$ ermittelt.

2.9.3. Selektive Hemmung

Zur Prüfung auf selektive Hemmung des Enzyms durch Clorgylinhydrochlorid als spezifischen MAO A – Hemmer und keine bzw. wesentlich geringere Hemmung durch R-(-)-Deprenylhydrochlorid als spezifischen MAO B – Hemmer wurden verschiedene Konzentrationen der beiden Substanzen getestet, die Hemmdaten ermittelt und miteinander verglichen (Test – Durchführung siehe Kap. 2.10.).

2.9.4. Stabilitätstest

Zur Testung auf Temperaturstabilität wurde das Dialysat (Proteinkonzentration 0,05 mg/ml) bei 4 °C und 22 °C gelagert und in definierten Zeitabständen eine Aktivitätsmessung durchgeführt. Als 100 % - Aktivität wurde die Aktivität von frisch aufgetautem Dialysat gesetzt.

2.10. Durchführung des Monoaminoxidase – Test II

Das Dialysat wurde mit Sörensen – Phosphatpuffer auf eine Proteinkonzentration von 0,05 mg/ml verdünnt. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 495 µl Enzymansatz mit 5 µl der in DMSO gelösten Extrakte oder Reinsubstanzen verschiedener Konzentrationen versetzt. Der Ansatz wurde unter Schütteln bei 30 °C über 5 Minuten inkubiert. Als Kontrolle wurden 495 µl Puffer mit 5 µl DMSO gemischt und als 100 % - Wert wurden zu 495 µl Enzymansatz 5 µl DMSO pipetiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden pro Well einer 96 –Well – MTP (Dreifachbestimmung) 10 µl einer 7,5 mM Kynuramindihydrobromid – Lösung (Endkonzentration: 500 µM) und 140 µl der inkubierten Probe pipetiert. Nach kurzem Schütteln wurde die Absorptionsmessung bei 360 nm und 30 °C durchgeführt. Die Messwertaufzeichnung erfolgte alle 60 Sekunden über einen Zeitraum von 10 Minuten.

Zur Auswertung und Bestimmung der Enzymaktivität bzw. Enzymhemmung wurden bei linearem Substratumsatz die Anstiege $\Delta E/\Delta t$ der einzelnen Proben, als Maß für die Enzymaktivität, berechnet. Die durchschnittlichen $\Delta E/\Delta t$ -Werte der Testextrakte oder Testsubstanzen (x % MAO A – Aktivität) wurden, unter Vernachlässigung des negativen Vorzeichens, relativ zum Anstieg der DMSO – Negativkontrolle (100 % MAO A – Aktivität) kalkuliert und als Hemmaktivität (x % MAO A – Hemmung) ausgedrückt.

2.11. Analytische und chemische Methoden

2.11.1. Extraktgewinnung

Perkolation

Ein Perkulator mit 40 cm Höhe, unterem Durchmesser von 14 cm und oberem Durchmesser von 19 cm wurde mit entfetteter Watte, zwei Lagen Filterpapier und einer 1 cm dicken Seesandschicht bestückt. Darauf wurden ca. 1000 g der gemahlene Droge *Salviae miltiorrhizae radix* aufgebracht. Das Drogenmaterial wurde mit Dichlormethan über zwei Stunden vorquellen gelassen, anschließend mit Filterpapier und Seesand bedeckt, um ein Aufwirbeln zu verhindern und mit Dichlormethan überschichtet. In ein Vorratsgefäß oberhalb, welches durch ein Rohr mit dem Perkulator verbunden war, wurde weiteres Dichlormethan eingefüllt, der Hahn des Perkulators geöffnet, so dass eine gleichmäßige Durchströmung der Droge mit dem Lösungsmittel möglich war und die Extraktion über 48 Stunden durchgeführt. Das Perkolat wurde in Rundkolben aufgefangen und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Im Anschluss an die Extraktion mit Dichlormethan wurde eine Extraktion über den gleichen Zeitraum mit Methanol durchgeführt, um die polaren Inhaltsstoffe zu gewinnen. Die gewonnenen Extrakte wurden bei 4 °C gelagert. Für weitere Untersuchungen wurde der Dichlormethanextrakt verwendet.

ASE – Extraktion

Die Gewinnung von kleineren Extraktmengen von *Salviae miltiorrhizae radix*, *Matricariae flos* und *Angelicae radix* erfolgte mit Hilfe der ASE – Anlage. Die Drogen wurden zunächst zerkleinert und anschließend entsprechend ihrer Dichte 1 bis 4 g gemahlene Droge in die Extrakthülsen eingewogen. Die Extraktion erfolgte bei einer Temperatur von 80 °C über jeweils 2 x 5 min. Dabei wurde zuerst der Dichlormethanextrakt gewonnen und anschließend mit Methanol extrahiert. Die erhaltenen Extrakte wurden mittels des Rotationsverdampfers zur Trockene eingengt.

SFE - Extraktion

Der SFE – Extrakt von *Salviae miltiorrhizae radix* wurde unter Einsatz des SFE – Systems erhalten. Zur Überprüfung der chromatographischen Zusammensetzung und der MAO – Hemmeigenschaften wurden verschiedene Extraktionsparameter variiert. Die Extraktion erfolgte über einen Zeitraum von 120 Minuten, bei 300 oder 600 bar. Als Extraktionsmittel

wurden reines CO₂, CO₂ + 0,5 % Ethanol und CO₂ + 5 % Ethanol eingesetzt, so dass insgesamt 6 verschiedene Extrakte resultierten.

2.11.2. Chromatographische Methoden

2.11.2.1. Dünnschichtchromatographie

Die Normalphasen – DC erfolgte an Kieselgel 60 F₂₅₄; die Umkehrphasen – DC an RP-18 F_{254s} (jeweils Aluminiumfertigplatten von Merck, Darmstadt).

Laufmittel:	1:	EtOAc-Petrolether (10:90)
	2:	EtOAc-Petrolether (20:80)
	3:	EtOAc-Petrolether (30:70): Fr. 6, 8, 12
	4:	CHCl ₃ (100): Fr. 5, 15
	5:	CH ₂ Cl ₂ -Petrolether (65:35): Fr. 8
	6:	CH ₂ Cl ₂ -Petrolether-MeOH (65:35:5): Fr. 8

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte anhand der Eigenfärbung einiger Verbindungen, unter der UV – Lampe und nach Ansprühen der DC – Platte mit *Godin's Reagenz* (Godin, 1954): Eine 1 % ige Lösung von Vanillin in EtOH wird mit 3 % iger HClO₄ im Verhältnis 1 : 1 gemischt (Godin's Reagenz 1). Die Platte wird mit dieser Sprühlösung und anschließend mit 10 % methanolischer H₂SO₄ (Godin's Reagenz 2) behandelt. Nach Erhitzen auf einer Heizplatte bei 120 °C für 1 – 2 Minuten werden die Färbungen sichtbar.

2.11.2.2. Säulenchromatographie (SC)

Die säulenchromatographischen Trennungen erfolgten an Kieselgel 60 (40-63 µm, Macherey-Nagel, Düren) in gefüllten Glassäulen: für die Extraktfraktionierung mit 100 cm Höhe und 5,5 cm Innendurchmesser und zur Aufreinigung einer Fraktion mit 50 cm Höhe und 3 cm Innendurchmesser. Das Säulenmaterial wurde im Laufmittel aufgeschlämmt und vorsichtig eingefüllt.

Laufmittel	1:	s. Kap. 2.11.2.1.
	2:	s. Kap. 2.11.2.1.
	3:	s. Kap. 2.11.2.1.
	5:	s. Kap. 2.11.2.1.
	6:	s. Kap. 2.11.2.1.
	7:	CH ₂ Cl ₂ -Petrolether-MeOH (65:35:10)
	8:	CH ₂ Cl ₂ -Petrolether-MeOH (65:35:20)

2.11.2.3. Niederdruckflüssigchromatographie (LPLC)

Präparative Isolierungen erfolgten mit einem Fluss von 4 ml/min an einer Lobar LiChrorep RP-18 Säule (40-63 μm , 310 x 25 mm, Merck, Darmstadt) unter Verwendung der LPLC – Anlage (Kap. 2.1.2.).

Laufmittel: 9: MeOH-H₂O (65:35): Fr. 15
 10: MeOH-H₂O (75:25): Fr. 6, 8

2.11.2.4. Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

Analytische HPLC:

Die Trennungen erfolgten an LiChrospher 100 RP-18 (5 μm , 125 x 4 mm) und LiChrospher 100 RP-18e (5 μm , 125 x 4 mm), unter Nutzung beider HPLC – Anlagen (Kap. 2.1.2.).

Als Laufmittel wurden 11: MeOH / H₂O:
 70 % (0 min) ? 100 % (20 min) ? 100 % (25 min)
 12: AcCN / NH₄CH₃COO 10mM:
 50 % (0 min) ? 85 % (20 min) ? 100 % (22 min) ?
 100 % (24 min)
 13: AcCN / NH₄CH₃COO 25mM:
 40 % (0 min) ? 70 % (20 min) ? 100 % (22 min) ?
 100 % (23 min)

mit einer Flussrate von 1 ml/min eingesetzt.

Präparative HPLC:

Die Trennungen wurden mit einer Flussrate von 4 ml/min an LiChrosorb RP-18 (7 μm , 250 x 25 mm), unter Verwendung der präparativen HPLC – Anlage (Kap. 2.1.2.) durchgeführt.

Laufmittel: 10: s. Kap. 2.11.2.3.

2.11.2.5. Gelchromatographie (Gelpermeationschromatographie)

Die Gelchromatographie an Sephadex LH-20 Gel (25-100 μm), welches vor dem Einfüllen in Glassäulen mindestens 24 Stunden im Lösungsmittel vorgequollen war, diente der Endreinigung von Substanzen. Die Chromatographie wurde entweder als offene Säulenchromatographie an Glassäulen mit 50 cm Höhe und 1 cm Innendurchmesser oder an einer Pharmacia – Säule mit 50 cm Höhe und 2,5 cm Innendurchmesser mit Pumpensystem (Kap.2.1.2.) durchgeführt. Als Fließmittel wurde Methanol verwendet.

2.11.3. Mikrofraktionierung und Probenaufbereitung

2.11.3.1. Mikrofraktionierung für MAO – Test

Die Mikrofraktionierungen der Dichlormethanextrakte der Drogen *Salviae miltiorrhizae radix*, *Matricariae flos* und *Angelicae radix* erfolgten mittels analytischer HPLC an der Anlage HP 1100 (Kap.2.1.2.). Als Trennsäulen wurden für *Salvia* eine LiChrospher 100 RP-18 – Kartusche (5 µm, 125 x 4 mm), für *Matricaria* und *Angelica* eine LiChrospher 100 RP-18e – Kartusche (5 µm, 125 x 4 mm) verwendet.

Die eingesetzten mobilen Phasen waren:

<i>Salvia miltiorrhiza</i> :	11: MeOH / H ₂ O:
	70 % (0 min) ? 100 % (20 min) ? 100 % (25 min)
<i>Angelica archangelica</i>	12: AcCN / NH ₄ CH ₃ COO 10mM:
	50 % (0 min) ? 85 % (20 min) ? 100 % (22 min) ?
	100 % (24 min)
<i>Matricaria recutita</i> :	13: AcCN / NH ₄ CH ₃ COO 25mM:
	40 % (0 min) ? 70 % (20 min) ? 100 % (22 min) ?
	100 % (23 min).

Die Fraktionierung wurde folgendermaßen durchgeführt:

	<i>Salvia</i>	<i>Angelica</i> <i>Angelica</i> + 0,5 % Clorgylin	<i>Matricaria</i> <i>Matricaria</i> + 0,5 % Harman
Lösungsmittel:	MeOH	AcCN	AcCN
Konzentration:	10 mg/ml	10 mg/ml	5 mg/ml
fraktionierte Extraktmenge:	800 µg	500 µg	500 µg
Fraktionen:	13	8	7
Flussrate:	1 ml/min	1 ml/min	1 ml/min

Im Falle von *Angelicae radix* wurde eine Fraktionierung des unveränderten Dichlormethanextraktes und eine Fraktionierung des Extraktes mit 0,5 % Clorgylin und im Falle von *Matricariae flos* zusätzlich zur Auftrennung des reinen Extraktes eine Fraktionierung unter Zusatz von 0,5 % Harman vorgenommen.

Die einzelnen Fraktionen wurden in 15 ml Gefäßen aufgefangen und mittels der Evaporator Zentrifuge (siehe Kap. 2.1.1.) getrocknet. Die Rückstände wurden in Dichlormethan aufgenommen, die erhaltenen Lösungen in 2 ml Gefäße überführt und unter Stickstoffstrom getrocknet.

Für die Testung der Fraktionen auf MAO – Hemmaktivität wurden diese in 50 µl DMSO gelöst.

2.11.3.2. Mikrofraktionierung für Tests im Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Zur Testung von *Salviae miltiorrhizae radix* in verschiedenen Testsystemen des DKFZ wurde der durch Perkolation gewonnene Dichlormethanextrakt ebenfalls einer Mikrofraktionierung unterzogen. Die HPLC – Bedingungen entsprachen denen in Kap. 2.11.3.1. beschrieben. 200 µg des in Methanol gelösten Extraktes wurden über einen Zeitraum von 28 min auf eine 96 – Well – MTP fraktioniert. Eine Fraktion entsprach dabei 0,3 min, was bei einem Fluss von 1 ml/min 0,3 ml sind. Die Platte wurde anschließend unter Luftstrom getrocknet und zur Testung im DKFZ Heidelberg bereitgestellt.

2.11.4. Spektroskopische Verfahren

2.11.4.1. UV – Vis – Spektroskopie (UV – Vis)

Die Aufnahme von UV/Vis – Spektren erfolgte in Quarzküvetten gegen das entsprechende Lösungsmittel als Blankwert.

Die Bestimmung von e (molarer Extinktionskoeffizient) für Kynuramindihydrobromid erfolgte durch Bestimmung der Extinktionswerte für 50, 100, 150 und 200 µM Kynuramindihydrobromid in Sörensen – Phosphatpuffer. Die Konzentrationen wurden als x – Werte gegen die dazugehörigen Absorptionen als y – Werte aufgetragen und der Anstieg der Geraden als e [$l \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] berechnet.

$$e = E / c \cdot d$$

d (Schichtdicke) = 1 [cm]

c (Konzentration)

2.11.4.2. Massenspektroskopie (MS) und LC-MS

Die LC – MS – Untersuchungen wurden durch Kopplung der HP 1100 – Anlage mit dem API 165 Massenspektrometer ermöglicht. Die mobilen Phasen der HPLC enthielten $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ als Ionisierungszusatz. Die Massenspektren wurden im positiven und negativen Modus im Scanbereich 100 – 1500 amu aufgenommen.

2.11.4.3. Nuclear – Magnetic – Resonance – Spektroskopie (NMR)

Die lyophilisierten Proben wurden in deuteriertem CHCl_3 gelöst und über entfettete Watte in einer Pasteurpipette in 5 mm – NMR – Röhrchen filtriert. Die NMR – Messungen erfolgten bei 400 MHz bzw. 250 MHz (^1H) und 100 MHz bzw. 63 MHz (^{13}C) bei 300 K.

2.11.5. Agarose – Gelelektrophorese von DNA

Zur Darstellung von Plasmid – DNA wurden Gele mit 1 % Agarose und Ethidiumbromid (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) verwendet. Die elektrophoretische Trennung wurde eindimensional in einer Wide Mini-Sub Cell GT – Kammer (BIORAD, Hercules, USA) bei 80 Volt unter Verwendung von TAE – Puffer durchgeführt. Anschließend erfolgte die Fragmentgrößenbestimmung anhand von DNA – Längenstandards durch Auswertung der Gele unter UV – Licht (302 nm).

2.11.6. SDS – Polyacrylamid – Gelelektrophorese und Coomassie – Färbung

Die Gelelektrophorese wurde mit standardisierten Gradientengelen (NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris – Gel) in einer XCell SureLock™ – Minikammer (beides invitrogen™, Karlsruhe) durchgeführt. Als Laufpuffer wurde MES/SDS – Puffer verwendet. Zur Probenvorbereitung wurden je 20 μl der Proteinlösungen mit 7,7 μl NuPAGE® LDS Sample Buffer (4 x) und 3,1 μl NuPAGE® Sample Reducing Agent (10 x) gemischt und über 5 min bei 95 °C im Heizblock erhitzt. Pro Slot wurden 30 μl der vorbehandelten Ansätze auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese bei 200 V über 55 Minuten durchgeführt. Als Marker wurde Prestained Protein Ladder (5 μl) mit ~ 10 – 160 kDa von Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Nach Auftrennung der Proteine erfolgte die Anfärbung des Gels unter Schütteln bei Raumtemperatur in Coomassie – Färbelösung. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie – Entfärbelösung unter Schütteln bei 50 °C über zwei Stunden entfärbt.

2.11.7. Quantitative Protein – Bestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte nach dem Protokoll für das Coomassie[®] Reagenz. Die Proben wurden mit Wasser in geeigneter Weise verdünnt. Nach Mischen von 5 µl Probelösung mit 250 µl Reagenz in einer 96 – Well – MTP (Doppelbestimmung) und Inkubation über 10 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Absorptionsmessung bei 595 nm. Als Standard wurde der zum Reagenz – Kit gehörende Albumin Standard eingesetzt.

2.12. Isolierung der Tanshinone

Für die Isolierung der Tanshinone wurde ausschließlich der mittels Perkolation hergestellte Dichlormethanextrakt von *Salviae miltiorrhizae radix* verwendet.

2.12.1. Fraktionierung des Dichlormethan – Extraktes

Die Fraktionierung des Gesamtextraktes erfolgte mittels Säulenchromatographie (siehe Kap. 2.11.2.2.). Hierzu wurde eine Kieselgeltrennsäule von 75 cm Höhe und 5,5 cm Durchmesser verwendet.

6,5 g Extrakt wurden in ca. 300 ml MeOH aufgenommen und nach Zugabe von 25 g Kieselgel durch Einengen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer an die Trennmatrix adsorbiert. Um ein vollständiges Entfernen von Feuchtigkeit zu erreichen, wurde der Ansatz über Nacht an der Gefriertrocknungsanlage getrocknet.

Als mobile Phasen wurden nacheinander

- | | | |
|----|----------------------------|-------------------|
| 1: | EtOAc-Petrolether (10:90): | Fraktionen 1 – 5 |
| 2: | EtOAc-Petrolether (20:80): | Fraktionen 6 – 7 |
| 3: | EtOAc-Petrolether (30:70): | Fraktionen 8 – 15 |

eingesetzt. Zum Aufbringen des adsorbierten Extraktes wurde das erste Fließmittel bis ca. 4 cm über der Säulenpackung entfernt und das Kieselgel – Extrakt – Pulver vorsichtig eingestreut (Schichthöhe ca. 2,5 cm). Anschließend wurde das Fließmittel bis kurz über der stationären Phase abgelassen, neues Fließmittel aufgebracht und der Vorgang so lange wiederholt, bis die Flüssigkeitsschicht über der Packung farblos war. Über der Säule war ein Vorratsgefäß angebracht, welches mit der Säule in Verbindung stand, so dass in dem Maße wie eluiert wurde, Laufmittel nachfließen konnte. Nach einem Vorlauf wurden Eluate mit

einem Volumen von ca. 150 ml gesammelt. Diese wurden mittels DC (Kieselgel 60 F₂₅₄, Fließmittel 3) und Detektion mit *Godin's Reagenz* (Kap. 2.11.2.1.) auf ihre Zusammensetzung überprüft, zu 15 Fraktionen vereinigt und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Die Säule wurde zum Schluss mit MeOH gespült. Die Spülfraktion wurde ebenfalls am Rotationsverdampfer getrocknet und nach Aufnahme in wenig Wasser lyophilisiert.

2.12.2. 15, 16 - Dihydrotanshinon I

10 mg Dihydrotanshinon I wurden nach Auftrennung von 80 mg der Fraktion 15 mittels LPLC (siehe Kap. 2.11.2.3.) unter Verwendung von MeOH-H₂O (65:35) als mobile Phase und anschließender Endreinigung über Sephadex LH 20 (Gelchromatographie, Kap.2.11.2.5.) gewonnen.

2.12.3. Tanshinon I

127 mg Fraktion 8 des Dichlormethanextraktes wurden mittels Säulenchromatographie (siehe Kap. 2.11.2.2.) in vier Unterfraktionen aufgetrennt. Hierzu wurde eine Kieselgeltrennsäule von 53 cm Höhe und 3 cm Durchmesser verwendet.

Als Fließmittel wurden aufeinander folgend

- 5: CH₂Cl₂-Petrolether (65:35)
- 6: CH₂Cl₂-Petrolether-MeOH (65:35:5)
- 7: CH₂Cl₂-Petrolether-MeOH (65:35:10)
- 8: CH₂Cl₂-Petrolether-MeOH (65:35:20)

eingesetzt. 7 mg Tanshinon I wurden aus 42,5 mg der zweiten Unterfraktion (Fraktion 8₂) mittels präparativer HPLC (siehe Kap.2.11.2.4.) erhalten und über Sephadex LH 20 (Gelchromatographie, Kap.2.11.2.5.) einer Endreinigung unterzogen.

2.12.4. Tanshinon IIA

Aus 13 mg von Fraktion 5 konnten 9 mg Tanshinon IIA, nach Chromatographie über Sephadex LH 20 (Gelchromatographie, Kap.2.11.2.5.) als Reinsubstanz gewonnen werden.

2.12.5. Cryptotanshinon

9 mg Cryptotanshinon wurden aus 10 mg von Fraktion 12 nach Chromatographie über Sephadex LH 20 (Gelchromatographie, Kap.2.11.2.5.) als Reinsubstanz erhalten.

2.13. Physikochemische Daten der Verbindungen

Die Charakterisierung der Strukturen erfolgte durch NMR – Spektroskopie (^1H NMR und ^{13}C NMR) und LC/ESI – MS im Vergleich der erhaltenen Daten mit Referenzwerten.

15, 16 - Dihydrotanshinon I

$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_3$; rötlich braune Nadeln in MeOH.

$k' = 6,83$ (HPLC Laufmittel 11); $R_f = 0,45$ DC (Kieselgel 60 F₂₅₄, Laufmittel 4),

$R_f = 0,44$ (Kieselgel 60 F₂₅₄, Laufmittel 3);

ESI MS pos. ion mode m/z 301 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), 279 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 261 ($[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$),

251 ($[\text{M}+\text{H}-28]^+$), 233 ($[\text{M}+\text{H}-18-28]^+$), 205 ($[\text{M}+\text{H}-18-28-28]^+$);

^1H NMR (400.13 MHz, CDCl_3): d 1.40 (3H, *d*, 6.8 Hz), 2.69 (3H, *s*), 3.68-3.61 (1H, *m*), 4.41 (1H, *dd*, 9.3 Hz, 6.3 Hz), 4.95 (1H, *t*, 9.6 Hz), 7.39 (1H, *d*, 6.9 Hz), 7.56 (1H, *dd*, 8.9 Hz, 7.0 Hz), 7.75 (1H, *d*, 8.7 Hz), 8.30 (1H, *d*, 8.7 Hz), 9.29 (1H, *d*, 8.9 Hz) (Ref.: Nagy et al., 1998);

^{13}C NMR (100.61 MHz, CDCl_3): d 125.1 (C-1, *d*), 130.4 (C-2, *d*), 128.9 (C-3, *d*), 135.0 (C-4, *s*), 132.2 (C-5, *s*), 131.9 (C-6, *d*), 120.3 (C-7, *d*), 128.3 (C-8, *s*), 126.2 (C-9, *s*), 134.8 (C-10, *s*), 184.4 (C-11, *s*), 175.8 (C-12, *s*), 118.4 (C-13, *s*), 170.5 (C-14, *s*), 81.6 (C-15, *t*), 34.7 (C-16, *d*), 18.8 (C-17, *q*), 19.8 (C-18, *q*) (Ref.: Ikeshiro et al., 1991).

Tanshinon I

$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_3$; rötlich braune Nadeln in MeOH.

$k' = 9,98$ (HPLC Laufmittel 11); $R_f = 0,33$ DC (Kieselgel 60 F₂₅₄, Laufmittel 5),

$R_f = 0,74$ DC (Kieselgel 60 F₂₅₄, Laufmittel 3);

ESI MS pos. ion mode m/z 300 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$), 277 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), 249 ($[\text{M}+\text{H}-28]^+$);

^1H NMR (400.23 MHz, CDCl_3): d 2.32 (3H, *d*, 1.0 Hz), 2.72 (3H, *br s*), 7.29 (1H, *d*, 1.1 Hz), 7.34 (1H, *d*, 7.0 Hz), 7.54 (1H, *dd*, 8.9 Hz, 7.0 Hz), 7.81 (1H, *d*, 8.7 Hz), 8.30 (1H, *d*, 8.8 Hz), 9.24 (1H, *d*, 8.9 Hz) (Ref.: Ryu et al., 1997)

^{13}C NMR (100.64 MHz, CDCl_3): d 125.2 (C-1, *d*), 131.1 (C-2, *d*), 128.8 (C-3, *d*), 135.6 (C-4, *s*), 134.1 (C-5, *s*), 133.3 (C-6, *d*), 119.2 (C-7, *d*), 130.1 (C-8, *s*), 123.7 (C-9, *s*), 133.2 (C-10, *s*), 183.9 (C-11, *s*), 176.2 (C-12, *s*), 122.2 (C-13, *s*), 161.6 (C-14, *s*), 142.5 (C-15, *d*), 120.9 (C-16, *s*), 9.2 (C-17, *q*), 20.3 (C-18, *q*) (Ref.: Ryu et al., 1997)

Tanshinon IIA

C₁₉H₁₈O₃; orange Nadeln in Ethylacetat.

k' = 11,56 (HPLC Laufmittel 11); R_f = 0,79 DC (Kieselgel 60 F₂₅₄, Laufmittel 4),

R_f = 0,81 DC (Kieselgel 60 F₂₅₄, Laufmittel 3);

ESI MS pos. ion mode *m/z* 312 ([M+NH₄]⁺), 295 ([M+H]⁺), 277 ([M+H-H₂O]⁺), 249 ([M+H-18-28]⁺);

¹H NMR (400.13 MHz, CDCl₃): d 1.22 (3H, *s*), 1.30 (3H, *s*), 1.65-1.62 (2H, *m*), 1.81-1.75 (2H, *m*), 2.23 (3H, *d*, 1.3 Hz), 3.18-3.15 (2H, *m*), 7.19 (1H, *d*, 1.3 Hz), 7.53 (1H, *d*, 8.1 Hz), 7.61 (1H, *d*, 8.2 Hz) (Ref.: Ryu et al., 1997)

¹³C NMR (100.61 MHz, CDCl₃): d 29.9 (C-1, *t*), 19.1 (C-2, *t*), 37.8 (C-3, *t*), 34.6 (C-4, *s*), 144.5 (C-5, *s*), 133.4 (C-6, *d*), 120.2 (C-7, *d*), 127.4 (C-8, *s*), 126.5 (C-9, *s*), 150.1 (C-10, *s*), 183.6 (C-11, *s*), 175.8 (C-12, *s*), 121.1 (C-13, *s*), 161.7 (C-14, *s*), 141.3 (C-15, *d*), 119.9 (C-16, *s*), 8.8 (C-17, *q*), 31.8 (C-18, *q*), 31.9 (C-19, *q*) (Ref.: Yang et al., 1996)

Cryptotanshinon

C₁₉H₂₀O₃; orange Nadeln in Hexan.

k' = 8,95 (HPLC Laufmittel 11); R_f = 0,54 DC (Kieselgel 60 F₂₅₄, Laufmittel 3);

ESI MS pos. ion mode *m/z* 319 ([M+Na]⁺), 297 ([M+H]⁺), 251 ([M+H-18-28]⁺);

¹H NMR (250.13 MHz, CDCl₃): d 1.21 (3H, *br, s*), 1.28 (3H, *d*, 6.8 Hz), 1.62-1.56 (2H, *m*), 1.77-1.68 (2H, *m*), 3.15 (2H, *t*, 6.4 Hz), 3.50 (1H, *m*), 4.29 (1H, *dd*, 9.4 Hz, 6.0 Hz), 4.82 (1H, *t*, 9.5 Hz), 7.42 (1H, *d*, 8.1 Hz), 7.57 (1H, *d*, 8.1 Hz) (Ref.: Sairafianpour et al., 2001)

¹³C NMR (62.9 MHz, CDCl₃): d 30.0 (C-1, *t*), 19.5 (C-2, *t*), 38.2 (C-3, *t*), 35.2 (C-4, *s*), 144.1 (C-5, *s*), 133.0 (C-6, *d*), 122.9 (C-7, *d*), 128.8 (C-8, *s*), 126.7 (C-9, *s*), 152.8 (C-10, *s*), 184.7 (C-11, *s*), 176.1 (C-12, *s*), 118.7 (C-13, *s*), 171.2 (C-14, *s*), 81.9 (C-15, *t*), 35.0 (C-16, *d*), 19.2 (C-17, *q*), 32.3 (C-18, *q*), 32.3 (C-19, *q*) (Ref.: Yang et al., 1996)

3. Ergebnisse

3.1. Monoaminoxidase – Test I

3.1.1. Extraktsscreening

Der Monoaminoxidase – Test I diente zunächst dem Screening von Extrakten aus der Wurzel von *Salvia miltiorrhiza* auf ihre Hemmaktivität gegenüber den beiden Isoenzymen MAO A und B. Getestet wurden der durch Perkolation gewonnene Dichlormethanextrakt, der mittels ASE erhaltene Methanolextrakt und die durch SFE gewonnenen Extrakte (SFE 1: CO₂, 0 % Ethanol, 300 bar, 135 min; SFE 2: CO₂, 5 % Ethanol, 120min) der Droge. Alle Extrakte wurden zu 25 mg/ml in DMSO gelöst und zur Aufnahme der Hemmkurven Verdünnungen der einzelnen Lösungen hergestellt. Die Auswertung der Tests zeigte deutlich eine hemmende Wirkung der lipophilen Extrakte, während der methanolische Extrakt keine bzw. vernachlässigbare inhibierende Eigenschaften aufwies. Der Vergleich der Hemmeigenschaften des Dichlormethanextraktes mit den beiden SFE – Extrakten zeigte eine etwas stärkere Hemmung der Monoaminoxidase durch den Dichlormethanextrakt, wobei die HPLC – Chromatogramme der Extrakte keine wesentlichen Unterschiede aufwiesen. Damit konnte gezeigt werden, dass die Lösungsmittelextraktion lipophiler Substanzen durchaus durch die Methode der Extraktion mit überkritischen Gasen ersetzt werden kann.

Die Hemmkurven (Abb. 3.1.) aller drei Extrakte zeigten auch bei hohen Testkonzentrationen keine 100 %ige Hemmung der Gesamtmonoaminoxidase (MAO A und B). Diese Tatsache deutete auf eine selektive Hemmung von einem der beiden Isoenzyme hin.

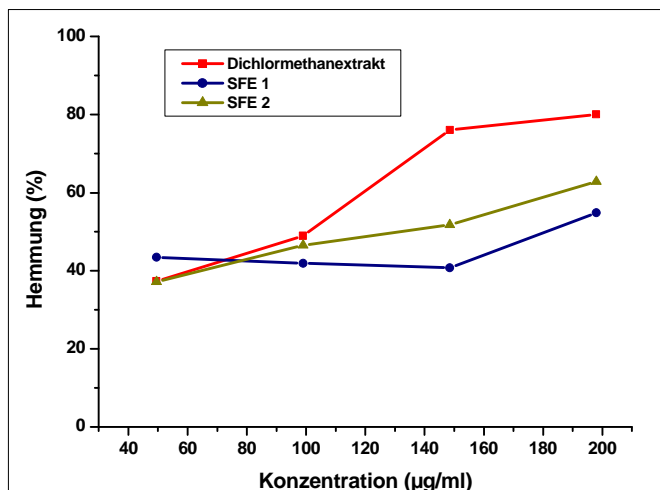


Abb. 3.1.

Hemmung der Gesamtmonoaminoxidase

Für die weitere aktivitätsbezogene Isolierung von möglichen Inhibitoren der Monoaminoxidase aus *Salvia miltiorrhiza* wurde der Dichlormethanextrakt verwendet.

Die Testung auf selektive Inhibition von MAO A oder B ergab eine eindeutige Präferenz des Extraktes gegenüber MAO A.

3.1.2. Mikrofraktionierung

Zur Charakterisierung der für die Hemmung verantwortlichen Verbindungen wurde die Methode des HPLC – basierten Auffindens von biologisch aktiven Naturstoffen angewandt. Hierzu wurden 800 µg des in Methanol gelösten Extraktes mittels analytischer HPLC aufgetrennt und das Eluat peakbezogen mikrofraktioniert. Die erhaltenen 13 Fraktionen wurden nach dem Trocknen in je 50 µl DMSO aufgenommen und der Testung im Bioassay unterzogen. Fünf der 13 Fraktionen zeigten eine deutliche Hemmung der Gesamtmonoaminoxidase (Abb. 3.2.). Die vorher vermutete selektive Hemmung von MAO A durch die Extraktkomponenten konnte nach dem Vergleich der Hemmwerte für MAO A (Abb. 3.3.) mit den Ergebnissen für MAO B (Abb. 3.4.) bestätigt werden. Durch Korrelation der Testdaten mit dem Chromatogramm der HPLC – Trennung (Abb. 3.5.) erfolgte die Zuordnung der Aktivitäten zu den einzelnen Mikrofraktionen. Mit Hilfe der in einer separaten chromatographischen Trennung erhaltenen LC/ESI – MS – Daten konnten durch Bestimmung der Molmassen und charakteristischer Fragmente erste Rückschlüsse auf die möglichen Strukturen gezogen werden. Der analytischen Mikrofraktionierung folgte anschließend eine präparative Chromatographie des Extraktes zur Isolierung, strukturellen Charakterisierung und Testung der erhaltenen Reinsubstanzen im Bioassay.

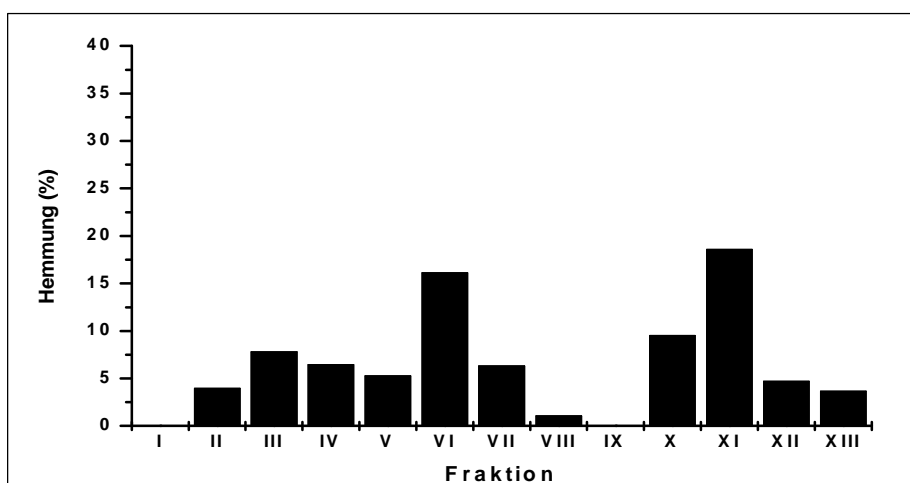


Abb. 3.2.
Hemmung der
Gesamtmonoaminoxidase

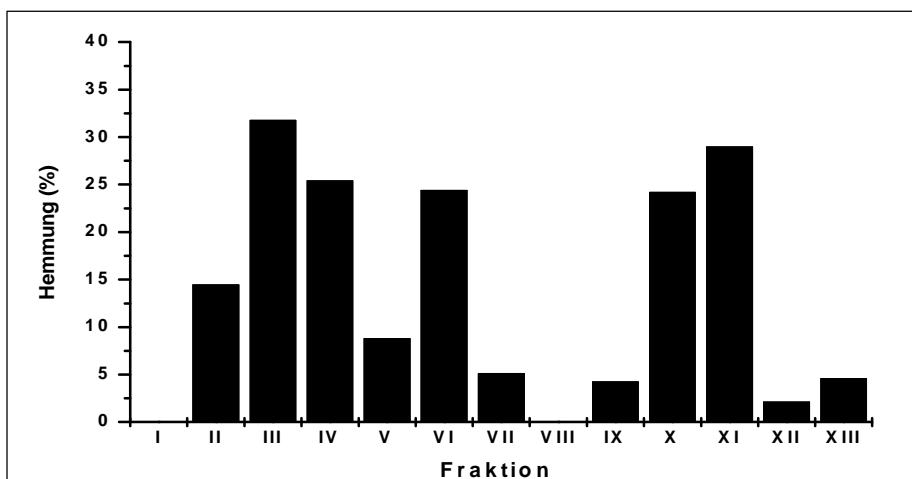


Abb. 3.3.
Hemmung der
Monoaminoxidase A

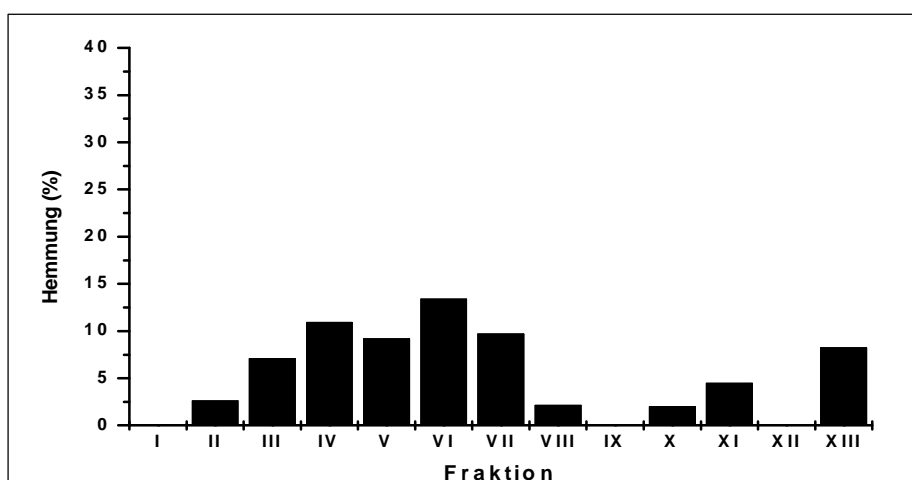


Abb. 3.4.
Hemmung der
Monoaminoxidase B

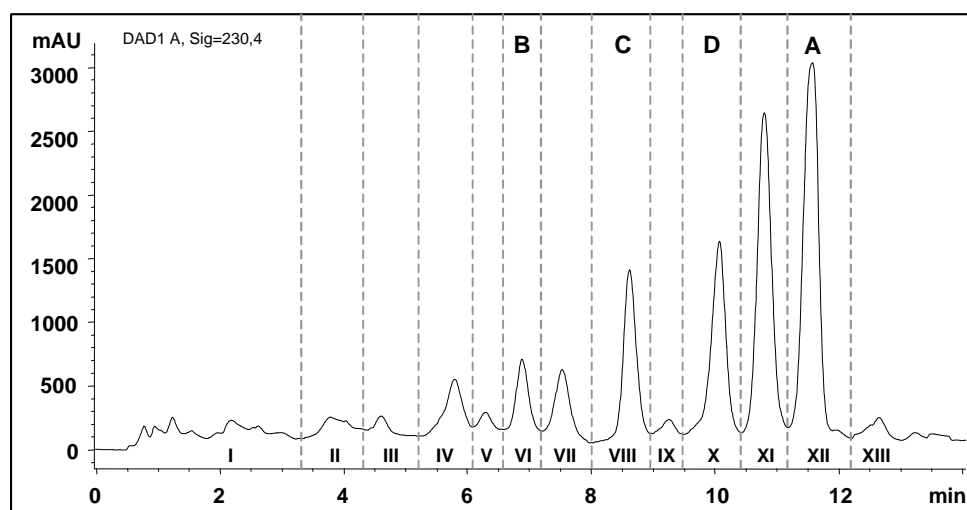


Abb. 3.5. HPLC – Chromatogramm des Dichlormethanextraktes gelöst in MeOH (200 µg)
LiChrospher 100 RP-18 – Kartusche (5 µm, 125 x 4 mm)
MeOH / H₂O: 70 % (0 min) ? 100 % (20 min) ? 100 % (25 min)

3.1.3. Testung der Reinsubstanzen

Die mit präparativen chromatographischen Verfahren (siehe Kap. 2.12.) gewonnenen und strukturell charakterisierten Reinsubstanzen, A) Tanshinon IIA, B) Dihydrotanshinon I, C) Cryptotanshinon und D) Tanshinon I wurden entsprechend ihrer Löslichkeit in DMSO gelöst. Von diesen Lösungen wurden Verdünnungen hergestellt und im Bioassay getestet.

Nach Auswertung der Hemmdaten konnten die Verbindungen Dihydrotanshinon I (Abb. 3.6.) und Tanshinon I (Abb. 3.7.) als Inhibitoren der Monoaminoxidase A identifiziert werden, während Tanshinon IIA (Abb. 3.8.) und Cryptotanshinon (Abb. 3.9.) keinerlei Hemmeigenschaften, weder gegenüber MAO A noch gegenüber MAO B, aufwiesen. Diese Ergebnisse bestätigten die bei der Mikrofraktionierung und anschließender Testung erhaltenen Resultate dahingehend, dass Dihydrotanshinon I etwas stärkere Hemmeigenschaften aufweist, als Tanshinon I und dass die anderen beiden Tanshinone keine bzw. gering wirksame Inhibitoren der Monoaminoxidase darstellen.

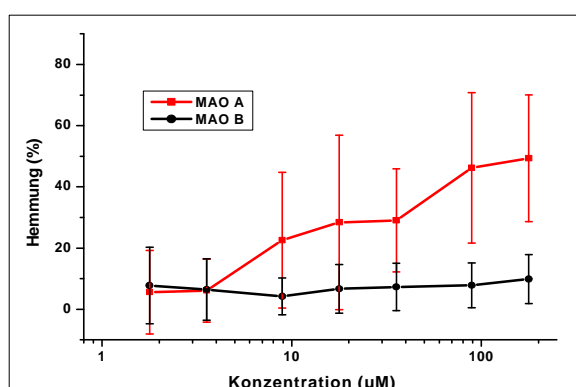


Abb. 3.6. Hemmkurven Dihydrotanshinon I

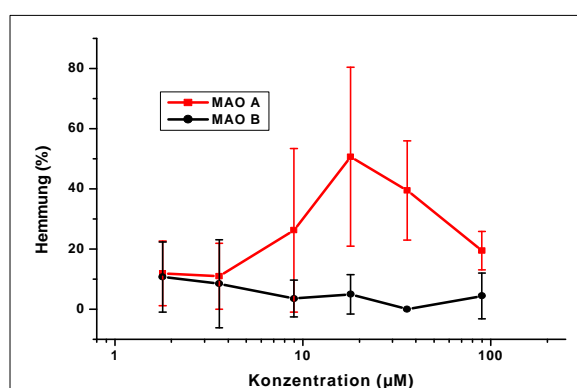


Abb. 3.7. Hemmkurven Tanshinon I

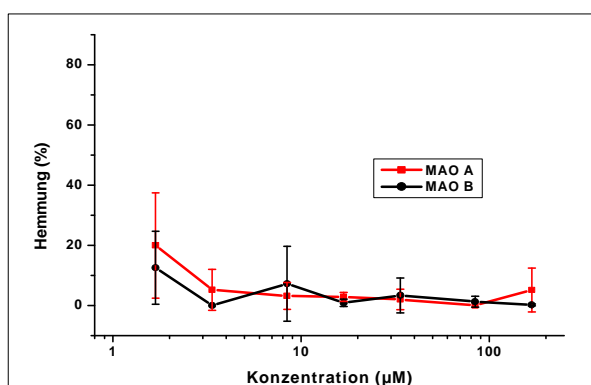


Abb. 3.8. Hemmkurven Tanshinon IIA

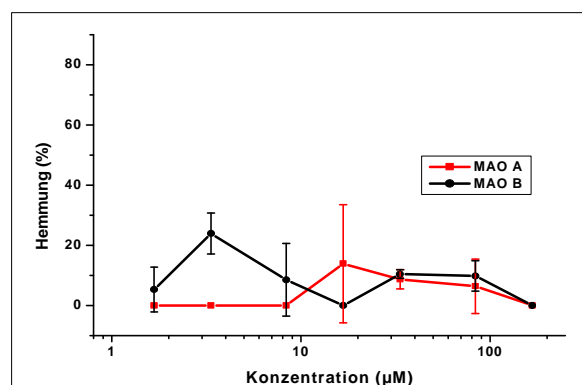


Abb. 3.9. Hemmkurven Cryptotanshinon

3.2. Fraktionierung des Dichlormethanextraktes und Gewinnung der Reinsubstanzen

Ausgehend von 6,5 g Dichlormethanextrakt wurden durch Fraktionierung über eine offene Kieselgelsäule 15 Fraktionen erhalten (Abb. 3.10.). Die HPLC – Chromatogramme der einzelnen Fraktionen, gelöst in Methanol, wurden mit dem Chromatogramm der Mikrofraktionierung, verglichen. Auf diese Weise konnten die durch Mikrofraktionierung gewonnenen Fraktionen den Kieselgelfractionen zugeordnet werden. Die weitere Aufreinigung zu Reinsubstanzen erfolgte dann unter dem Gesichtspunkt der Bioaktivität im Monoamin – Oxidase – Test, wobei sowohl aktive als auch inaktive Verbindungen isoliert werden sollten.

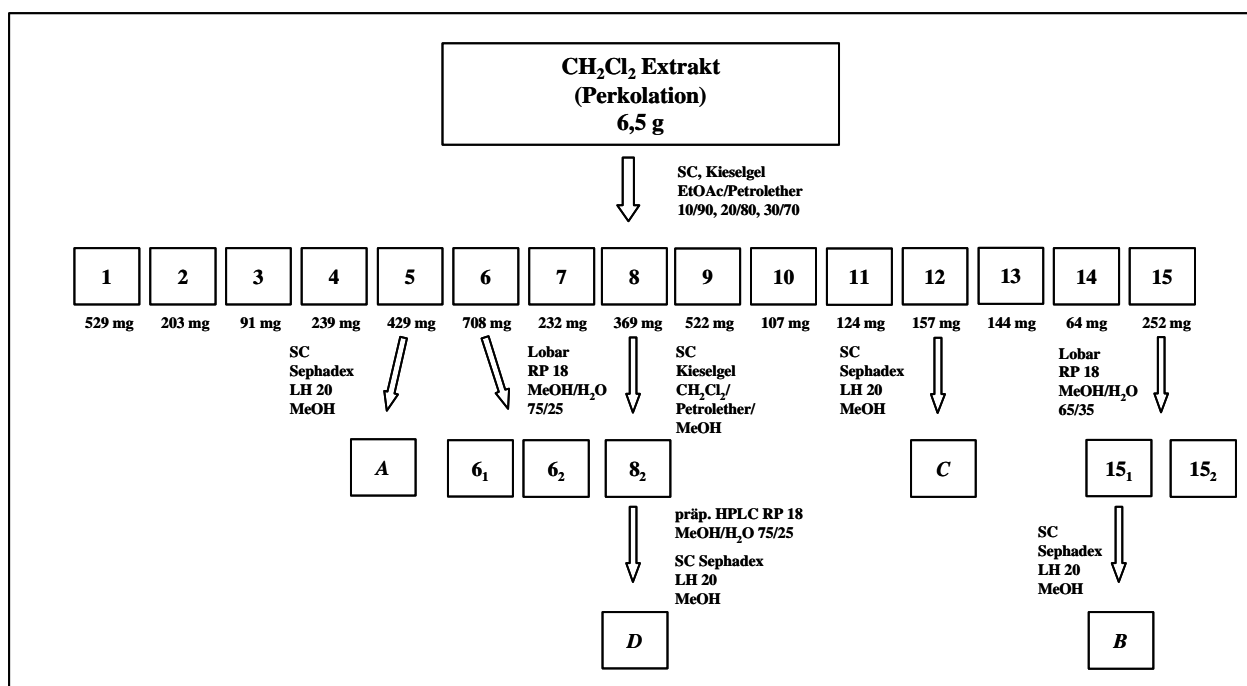
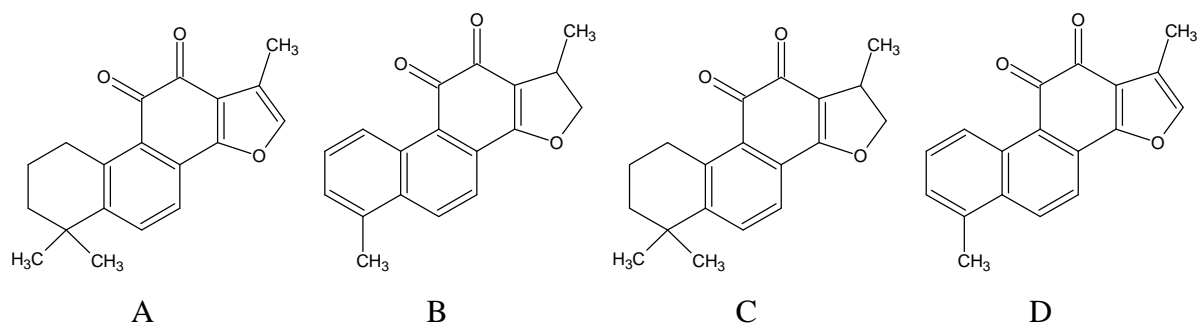


Abb. 3.10. Fraktionierungsschema des Dichlormethanextraktes

Durch den Vergleich der NMR – Daten (¹H, ¹³C) und der LC/ESI – MS – Werte mit Literaturdaten konnten 4 Tanshinone, die in die Klasse der Phenanthro[1,2-b]furan-10,11-dione einzuordnen sind, identifiziert werden. Es handelt sich dabei um Tanshinon IIA (A), Dihydratanshinon I (B), Cryptotanshinon (C) und Tanshinon I (D).



3.3. Klonierung und Gewinnung rekombinanter Monoaminoxidase A

Aufgrund der nachgewiesenen Selektivität der Tanshinone gegenüber der Monoaminoxidase A sollte eine Möglichkeit gefunden werden dieses Isoenzym isoliert und in ausreichender Menge und Aktivität zu gewinnen, um eine genauere Testung der Substanzen in einem Bioassay zu ermöglichen. Die Isolierung aus tierischem Material und die Verwendung der erhaltenen Mitochondrien erschien auf Grund des Vorkommens beider Isoenzyme, starker Schwankungen der Enzymaktivitäten und der hohen Standardabweichungen der Hemmdaten (siehe Abb. 3.6. bis 3.9.) nicht als sinnvoll.

Aus diesem Grund wurde humane Leber – Monoaminoxidase A, nach Klonierung der kodierenden Region in einen Expressionsvektor, in einem eukaryotischen System (*Saccharomyces cerevisiae*) überexprimiert.

3.3.1. Klonierung

Zur Überexpression des Monoaminoxidase A – Fusionsproteins in *S. cerevisiae* wurde der Vektor pEG-KT (Kap. 2.1.9.) verwendet, der u.a. über ein 2 μ Origin zur Replikation in hoher Kopienzahl und zwei Selektionsmarkern (*URA3*, *Leu2d*) verfügt. Die Expression des GST – Gens steht unter der Kontrolle eines *CYC1* – Basal – Promotors (Cytochrom C₁ – Oxidase) und einer Galactosespezifischen Aktivierungssequenz (*GAL1* – *10UAS*). Ein integrierter Glycin – Linker nahe der Thrombin – Schnittstelle führt zu einer Erhöhung der Spaltungseffizienz des Fusionsproteins in seine zwei Anteile.

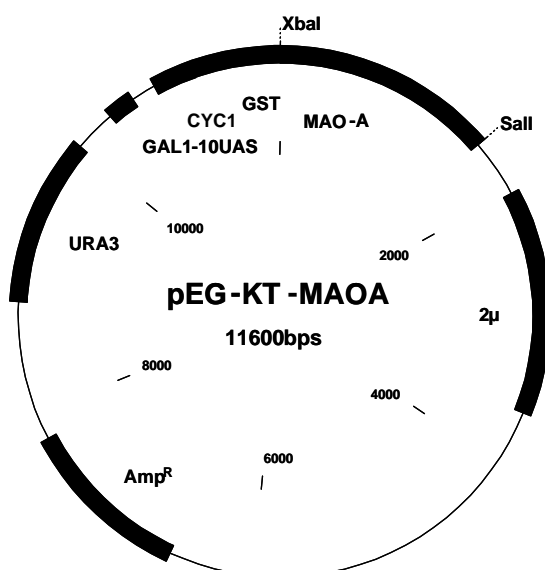


Abb. 3.11. Expressionsvektor pEG-KT-MAO A

Die MAO A kodierende Region aus dem Plasmid HM11 (Kap. 2.1.9.) wurde mittels PCR unter Verwendung der beiden Primer MAOA-5-1 und MAOA-3-1 (Kap. 2.1.11.) amplifiziert. Das PCR – Produkt (MAO A – PCR) und der aufgereinigte Vektor pEG–KT wurden mit den Restriktionsendonukleasen *SalI* und *XbaI* gespalten. Nach Aufreinigung der Restriktionsprodukte erfolgte die Ligation des Inserts in den Vektor und die Transformation des erhaltenen Plasmids pEG–KT–MAO A in den Bakterienstamm *E. coli* DH5a mit Hilfe der CaCl_2 – Methode (Mandel und Higa, 1970). Die Richtigkeit des konstruierten Plasmids wurde durch Restriktionsanalysen mit *BamHI* und *SalI/XbaI* und durch eine Teilsequenzierung der Plasmid – DNA durch die Firma MWG – Biotech AG (Ebersberg) überprüft. Sowohl die Kontrollverdaus und anschließende Auftrennung der Reaktionsprodukte mittels Agarose – Gelelektrophorese (Kap. 2.11.5.) als auch die Überprüfung der erhaltenen DNA – Sequenzen bestätigten die Fehlerfreiheit des Plasmides.

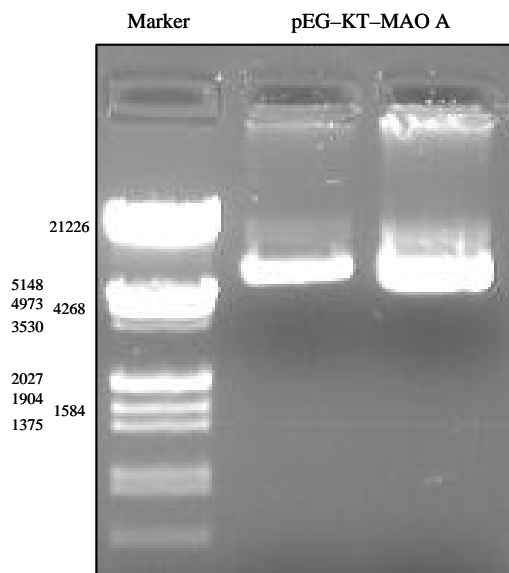


Abb. 3.12. Agarose – Gelelektrophorese: *pEG-KT-MAO A* (Größenangaben in bp)

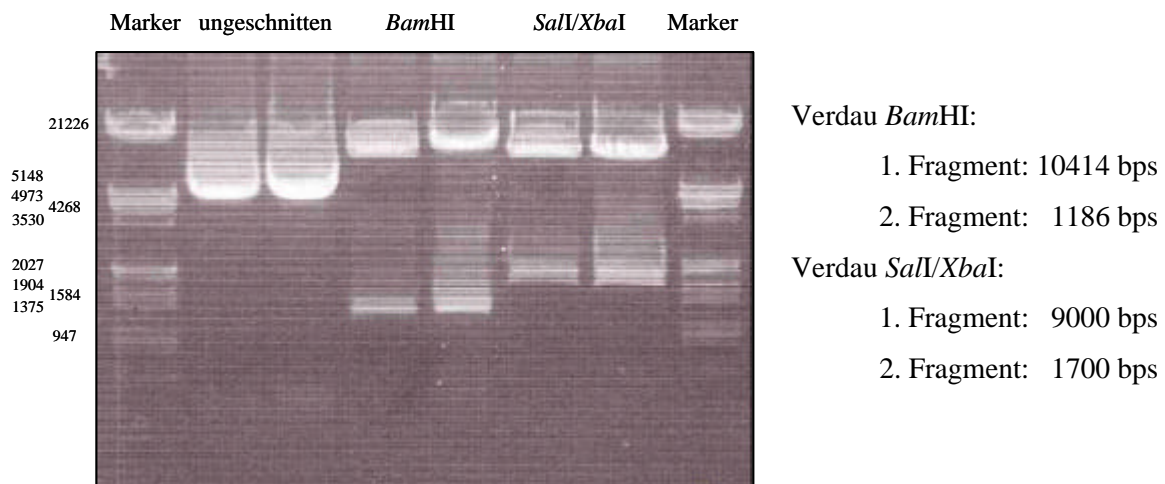


Abb. 3.13. Agarose – Gelelektrophorese: Kontrollverdau pEG–KT–MAO A

Das Plasmid pEG–KT–MAO A wurde in *Saccharomyces cerevisiae* CEN–PK2 (Kap. 2.1.8.) nach der Methode von Klebe (1983) transformiert. Die Selektion der Hefeklone erfolgte durch das Wachstum auf Minimalmedium mit Glucose (Kap. 2.1.7.) ohne Uracil.

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Plasmids wurden die Plasmid – tragenden Hefezellen bei 30 °C in Minimalmedium mit Glucose unter Schütteln bis zur maximalen Zelldichte angezogen und anschließend zur Induktion der Bildung des GST – Fusionsproteins weiter bis zur Verdopplung der Zelldichte bei 30 °C in Minimalmedium mit Galactose kultiviert. Das Fusionsprotein wurde bis zur Stufe des Dialysates aufgereinigt und im Monoaminoxidase – Test II (Kap. 2.10.) unter Verwendung von Clorgylin als selektiven MAO A – Inhibitor getestet. Nach Bestätigung der Induzierbarkeit mit Galactose und Funktionalität des Enzyms erfolgte eine Fermentation zur Erzielung größerer Mengen an Biomasse.

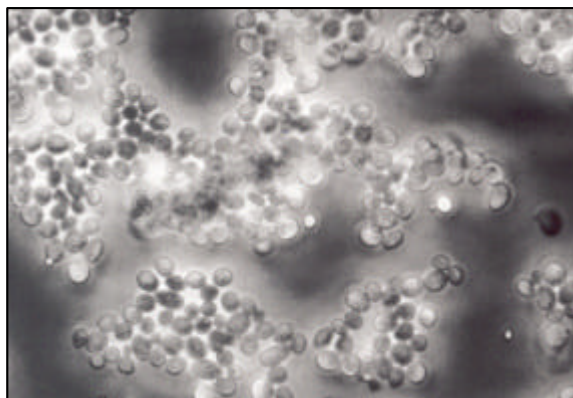
3.3.2. Fermentation

Die Fermentation von transformierter *S. cerevisiae* erfolgte über einen Zeitraum von 67 Stunden und war unterteilt in eine batch – Phase (Phase I), eine feed batch – Phase (Phase II) und eine Induktionsphase (Phase III). In den ersten beiden Phasen wurden Fermentationsmedium mit 1 % Glucose und in der Induktionsphase Fermentationsmedium mit 3 % Galactose als Kulturmedien verwendet. Nach Ernte der Hefezellen und Abtrennen der Kulturbrühe durch Zentrifugation wurden 210 g Hefezellen als Gesamtfeuchtmasse erhalten. Die Zellen wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei –70 °C gelagert.

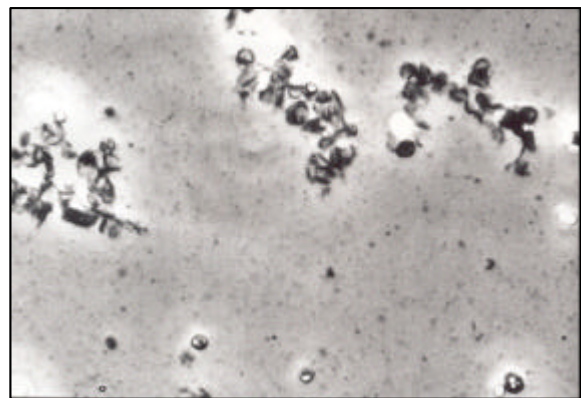
3.3.3. Isolierung

Die Hefezellen wurden nach der Resuspension in Tris HCl/EDTA – Puffer (unter Zusatz von 0,15 μ M Aprotinin und 10 μ M Leupeptin als Proteaseinhibitoren) mit Hilfe des EmulsiFlex – C5 Homogenisators portionsweise bearbeitet (siehe Abb. 3.14.), um eine Freisetzung des Zellinneren zu erreichen. Anschließend wurden nach Abtrennen des Zellbruchs durch Zentrifugation und Ultrazentrifugation des erhaltenen Überstandes die Mitochondrien gewonnen. Diese wurden portionsweise bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

Insgesamt wurden aus 210 g Hefezellen 25 g Mitochondrien – Pellets erhalten.



unbehandelte Hefezellen



behandelte Hefezellen

Abb. 3.14 Behandlung der Hefezellen mit dem EmulsiFlex – C5 Homogenisator

Zur Isolierung der Proteine aus den Mitochondrienmembranen wurden die Mitochondrien (je ca. 3,5 g) mit Triton[®] X 100, einem nichtionischem Tensid, behandelt und die freien Proteine anschließend durch Ultrazentrifugation von anderen Membranbestandteilen abgetrennt. Zur Entfernung des die weitere Aufreinigung störenden Tensides wurden die Proteine mit Ammoniumsulfat ausgefällt und nach Aufnahme in Tris HCl/EDTA – Puffer (unter Zusatz von 0,15 μ M Aprotinin und 10 μ M Leupeptin als Proteaseinhibitoren) zur Abtrennung der hohen Salzkonzentration einer Dialyse gegen Tris HCl/EDTA – Puffer unterzogen. Das erhaltene Dialysat diente zunächst den weiteren Aufreinigungsversuchen des Fusionsproteins und nach Auswertung dieser Versuche zum einen der funktionellen Charakterisierung des Enzyms und zum anderen als Enzymquelle im Monoaminoxidase – Test II.

3.3.4. Versuche zur Gewinnung des Fusionsproteins

Zur Abtrennung der Monoaminoxidase A als GST – Fusionsprotein von anderen Begleitproteinen wurde das Dialysat mit Glutathion – SepharoseTM 4B entsprechend der Vorschrift behandelt. Das Fusionsprotein wurde nach Elution von der Matrix im SDS – Polyacrylamid – Gel auf seine Proteingröße und im Bioassay auf seine Funktionalität überprüft. Im SDS – Page (Abb. 3.15.) sind als Bestandteile der Eluate MAO A – GST (94 kDa), freie MAO A (65 kDa), abgespaltenes GST (29 kDa) und GST der Hefe (26 kDa) zu erkennen. Dieses Resultat und die Beobachtung, dass das freie Enzym auch schon im Dialysat zu erkennen ist, deutet darauf hin, dass durch die Aufreinigungsprozesse eine Spaltung des Fusionsproteins erfolgt.

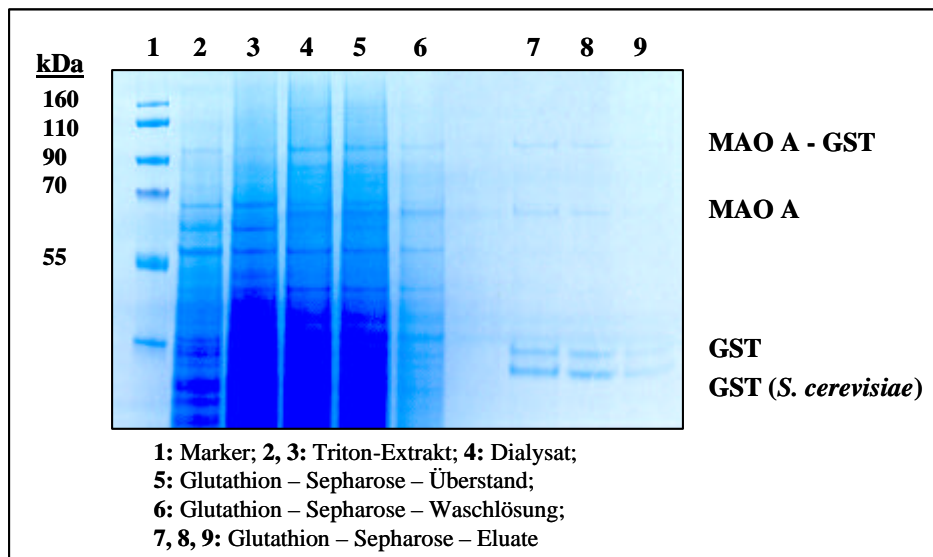


Abb. 3.15. SDS – Page

Zur Kontrolle auf Funktionalität wurden, nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen (Kap. 2.11.7.), verschiedene Verdünnungen (1:10, 1:20, 1:50, 1:100) der Eluate mit Sörensen – Phosphatpuffer hergestellt und diese entsprechend der Vorschrift für den Monoaminoxidase – Test II (Kap. 2.10.) über 5 min bei 30 °C mit 1 µM Clorgylin bzw. mit Sörensen – Phosphatpuffer inkubiert und die Messung und Auswertung nach vorgegebenem Schema durchgeführt.

Die Testresultate zeigten, dass im Eluat keine nachweisbaren bzw. nicht reproduzierbaren Enzymaktivitäten vorlagen, obwohl im SDS – Page eindeutige Protein – Banden zu erkennen waren. Um auszuschließen, dass es sich um einen zufälligen Fehler handelte wurde mit einem

weiteren Teil der Mitochondrien die Prozedur wiederholt. Auch hier zeigten die Eluate keine Aktivitäten.

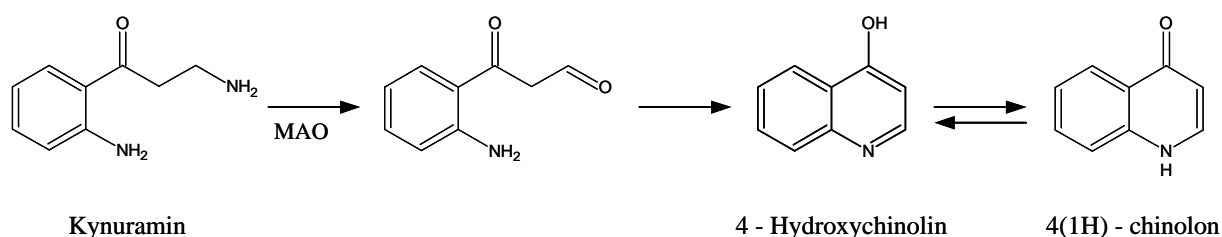
Aufgrund dieser Ergebnisse wurde anschließend geprüft, an welcher Stelle der Aufreinigung ein Aktivitätsverlust vorlag. Dazu wurden der Triton – Extrakt und das Dialysat in verschiedenen Verdünnungen mit Sörensen – Phosphatpuffer ebenfalls im Bioassay getestet. Hier konnten eindeutig Enzymaktivitäten und eine Hemmbarkeit durch Clorgylin festgestellt werden. Damit wurde gezeigt, dass der Verlust der Aktivität nur durch den Glutathion – Sepharose – Schritt erfolgt sein konnte.

Aufgrund der gezeigten Aktivitätsverluste durch den letzten Aufreinigungsschritt wurde zur Charakterisierung des Enzyms und als Enzymquelle für die Testung der Tanshinone im Monoaminoxidase – Test II ausschließlich das Dialysat verwendet.

3.4. Charakterisierung der rekombinanten MAO A

3.4.1. Enzymkinetik

Zur funktionellen Charakterisierung der Monoaminoxidase A mit Kynuramindihydrobromid als Substrat wurde die Kinetik der enzymatischen Reaktion bestimmt.



Die Testdurchführung zur Ermittlung der Geschwindigkeit (v) der enzymatischen Reaktion als Konzentrationsänderung (Δc) pro Zeitänderung (Δt) nach:

$$v = \Delta c / \Delta t \quad \Delta c = \Delta E / \epsilon \cdot d$$

$$v = \Delta E / \Delta t \cdot \epsilon \cdot d \quad [\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$$

$$\Delta t = 1 [\text{min}]$$

$$\epsilon \text{ (molarer Extinktionskoeffizient)} = 4,122 \quad [\text{l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$$

$$d \text{ (Schichtdicke)} = 0,6 [\text{cm}]$$

bzw. $v = \Delta E / 2,4732 \quad [\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$

erfolgte wie in Kapitel 2.9.2. beschrieben.

Die Substratkonzentrationen c [μM] und die dazugehörigen Geschwindigkeiten v [$\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] wurden anschließend in verschiedenen Graphiken gegeneinander dargestellt.

Im Michaelis – Menten – Plot (Abb. 3.16.) wurden c als x – Wert und v als y – Wert und im Lineweaver – Burk – Plot (Abb. 3.17.) $1/c$ als x – Wert und $1/v$ als y – Wert aufgetragen.

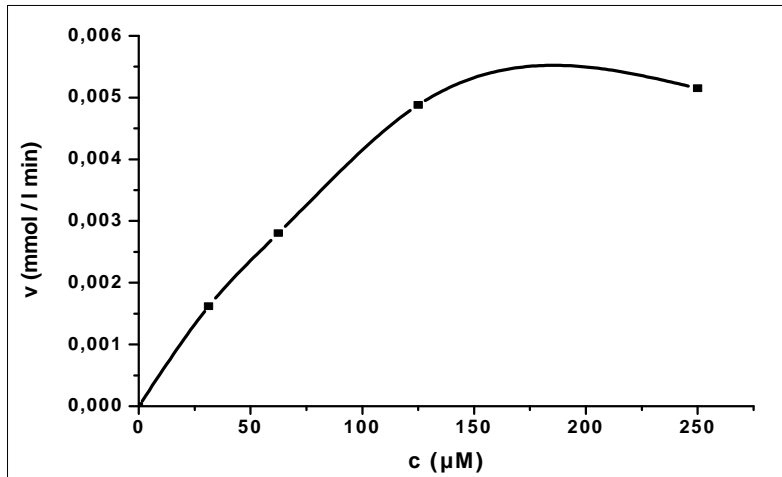


Abb. 3.16. Michaelis – Menten – Plot

Aus dem Lineweaver – Burk – Plot (Abb. 3.17.) lässt sich nach Anlegen einer Geraden an die Kurve und Berechnung der Geradengleichung ($y = mx + n$) der Schnittpunkt mit der x – Achse als $-1/K_m$ bestimmen und daraus die Michaelis – Menten – Konstante (K_m) berechnen.

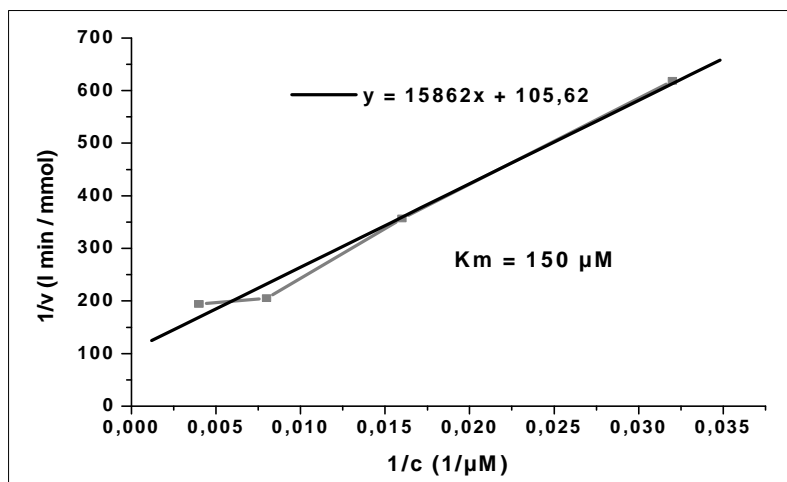


Abb. 3.17. Lineweaver – Burk – Plot

Der Vergleich von $K_m = 150 \mu\text{M}$ mit Literaturdaten (Tab. 3.1.) von sowohl überexprimierter als auch aus menschlichen Geweben isolierter MAO A ergab eine Übereinstimmung dieser Größe.

Literatur	K_m	Enzymquelle
Weyler und Salach, 1985	170 μM	Plazenta (Mensch)
Weyler et al., 1990	125 μM	<i>S. cerevisiae</i> (Überexpressierung Leber MAO A)
Tan et al., 1991	147 μM	Plazenta (Mensch)
	160 μM	Leber (Mensch)

Tab. 3.1.

3.4.2. Enzymhemmung

Zur weiteren Charakterisierung des Enzyms, wurde eine Prüfung mit Clorgylin, einem selektiven Inhibitor von MAO A und Deprenyl, einem selektiven Hemmer von MAO B im Monoaminoxidase – Test II (Kap. 2.10.) durchgeführt.

Die Auswertung der Ergebnisse (Abb. 3.18.) ergab eindeutig, dass es sich um die Monoaminoxidase A handelt, da der IC_{50} – Wert für Clorgylin mit 0,014 μM deutlich unter dem für Deprenyl mit 20 μM liegt. (Vergleich Literatur: Shih et al., 1999: 10^{-9} M für Clorgylin und 10^{-6} M für Deprenyl)

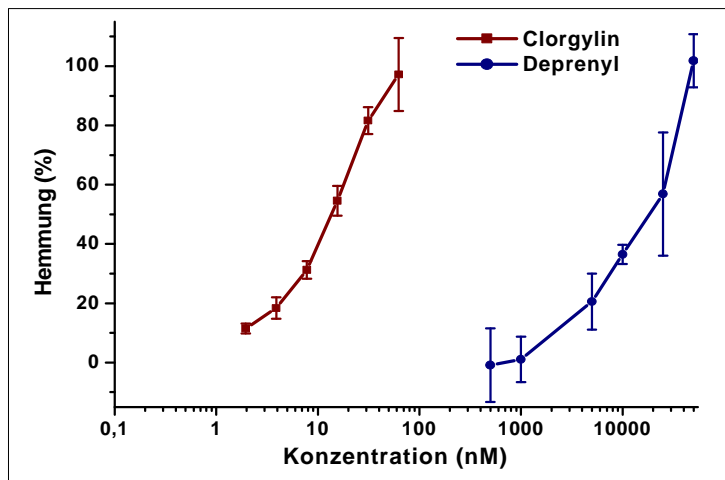


Abb. 3.18. Hemmkurven für Clorgylin und Deprenyl

3.4.3. Stabilitätstest

Zur Testung des Enzyms auf seine Temperaturstabilität wurde das Dialysat in einer Proteinkonzentration von 0,05 mg/ml zum einen bei Raumtemperatur (22 °C) und zum anderen im Kühlschrank (4 °C) gelagert. Nach definierten Zeitabständen (4, 8, 12, 24, 32, 48, 56 und 72 Stunden) wurde gemäß der Vorschrift für den Monoaminoxidase – Test II eine

Aktivitätsbestimmung durchgeführt. Die Aktivität von frisch aufgetautem Dialysat wurde als 100 % Wert gesetzt.

Aus der Abbildung 3.19. ist deutlich die geringere Stabilität des Enzyms bei Lagerung oberhalb von 4 °C zu erkennen. Bereits nach 56 Stunden ist die Aktivität auf 50 % gesunken, wohingegen bei der Aufbewahrung bei 4 °C auch nach 72 Stunden immer noch 80 % der ursprünglichen Aktivität vorhanden sind.

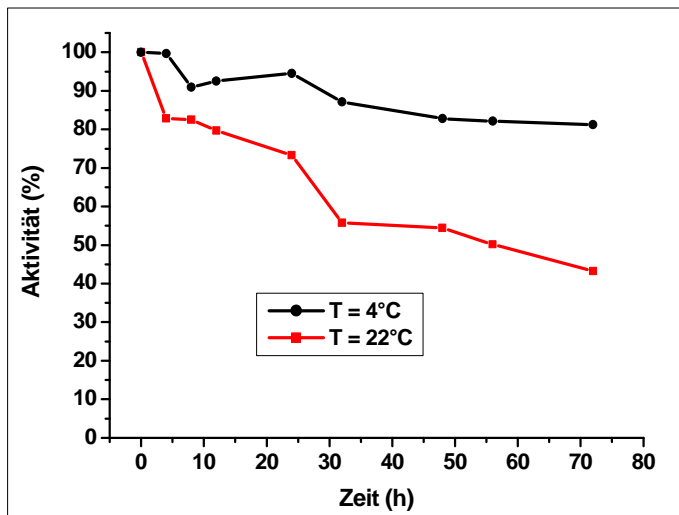


Abb. 3.19. Temperaturstabilität der Monoaminoxidase A

3.4.4. Berechnung der Enzymaktivität

Die Enzymaktivität, der pro Zeiteinheit katalysierte Umsatz von Substraten, stellt einen weiteren wichtigen Parameter zur Beschreibung eines Enzyms dar.

Ausgedrückt werden kann diese Größe als Volumenaktivität A_{Vol} [U/ml] oder bei bekannter Enzymkonzentration im Test als spezifische Aktivität A_{spez} [U/mg].

Die Volumenaktivität lässt sich wie folgt berechnen:

$$A_{\text{Vol}} = \frac{V}{v} \cdot \frac{?E}{?t \cdot d \cdot e} \quad A_{\text{Vol}} = \frac{\mu\text{l}}{\mu\text{l}} \cdot \frac{\text{mol} \cdot \text{cm}}{\text{s} \cdot \text{cm} \cdot \text{l}} = \frac{\text{mol}}{\text{s} \cdot \text{l}} = \frac{\text{kat}}{\text{l}}$$

V (Volumen des Messansatzes) = 150 μl

v (Volumen der Enzymlösung) = 140 μl

$?E$ (Extinktionsänderung pro 1 min) = 0,0059 (bei Proteinkonzentration von 0,05 mg/ml)

$?t$ (Zeit in s) = 60 s

d (Schichtdicke) = 0,6 cm

e (molarer Extinktionskoeffizient) = 4122 $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Danach ergibt sich für die Volumenaktivität A_{Vol} der Monoaminoxidase A im Dialysat ein Wert von $4,26 \cdot 10^{-8}$ kat/l bzw. bei 1 Unit (U) = 16,667 nkat ein Wert von 2,556 U/l.

3.5. Monoaminoxidase – Test II

Für die Testung der bereits isolierten Tanshinone oder im Rahmen späterer Arbeiten für die Prüfung weiterer Reinsubstanzen bzw. Extrakte auf ihre Hemmeigenschaften gegenüber der Monoaminoxidase A wurde unter Nutzung des Dialysates als enzymhaltige Lösung ein neuer Assay im gleichen Puffersystem entwickelt (Kap. 2.10.). In Anlehnung an den ersten Bioassay erfolgten aufgrund Aspekte der Enzymstabilität Testoptimierungen dahingehend, dass die Inkubations – und Messtemperatur von 37 auf 30 °C und die Dauer beider Prozesse von 20 auf 5 Minuten bzw. von 60 auf 10 Minuten reduziert wurden. Als Substrat diente wie bereits im ersten Test Kynuramindihydrobromid, allerdings in einer Testkonzentration von 500 µM und nicht 100 µM wie im Test I. Für die Bestimmung dieser Substratmenge wurde zunächst die Konzentration gesucht, bei der ein linearer Substratumsatz vorlag. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von Kynuramindihydrobromid (31,25 µM, 125 µM, 250 µM und 500 µM) in Sörensen – Phosphatpuffer im Bioassay (Kap. 2.10.) eingesetzt und der Substratumsatz, in Form der Extinktionsabnahme bei 360 nm, über den Zeitraum von 1 bis 10 Minuten graphisch dargestellt. Aus dieser Darstellung war zu entnehmen, dass bei einer Substratkonzentration von 500 µM ein linearer Umsatz über den Messzeitraum vorliegt und damit kein Einfluss auf die Kinetik der Reaktion besteht.

3.5.1. Mikrofraktionierung und Testung gespikter Pflanzenextrakte

Nach der Testoptimierung sollte zunächst geprüft werden, ob der Assay für die Identifizierung biologisch aktiver Naturstoffe in komplexen Extraktgemischen unter Nutzung der HPLC – basierenden Mikrofraktionierung geeignet ist. Dazu wurden pflanzlichen Extrakten bekannte MAO A – Inhibitoren zugesetzt und nach erfolgter Mikrofraktionierung (Kap. 2.11.3.1.) im Vergleich zu reinen Extrakten eine Testung (Kap. 2.10.) der Fraktionen durchgeführt. Getestet wurden die Dichlormethanextrakte von *Matricariae flos* mit und ohne 0,5 % Harman, einem Betacarbolin – Alkaloid, und *Angelicae radix* mit und ohne 0,5 % Clorgylin.

Die Auswahl der Extrakte erfolgte im Hinblick auf das Vorhandensein strukturell verschiedener Komponenten, die eine gute UV/Vis – Absorption aufweisen und von denen

noch keinerlei signifikante ZNS – Aktivität bekannt war. Die Extrakte wurden zunächst auf ihre inhibierenden Eigenschaften gegenüber der Monoaminoxidase A geprüft und anschließend eine Mikrofraktionierung der originalen und der gespikten Extrakte durchgeführt.

Durch Korrelation der HPLC – Chromatogramme mit den dazugehörigen Aktivitätsprofilen konnte eine genaue Zuordnung der Peaks zu den einzelnen Fraktionen erfolgen.

Wie aus den Abbildungen 3.20. und 3.21. zu erkennen ist, kommt es durch Zusatz der Inhibitoren Harman bzw. Clorgylin zu einem deutlichen Anstieg der Hemmaktivität in der entsprechenden Mikrofraktion im Vergleich zum reinen Extrakt. Bei allen anderen Fraktionen traten keine signifikanten Unterschiede der Aktivitäten zwischen gespiktem und reinem Extrakt auf. Interessanter Weise zeigten einige Peaks in *Angelicae radix* auch gewisse inhibierende Eigenschaften, wie man aus dem Aktivitätsprofil des reinen Extraktes entnehmen kann. Aber auch diese Aktivitäten veränderten sich durch den Zusatz von Clorgylin nicht.

Damit konnte gezeigt werden, dass der neu entwickelte Test zur Identifizierung von Inhibitoren der Monoaminoxidase A in komplizierten Gemischen unter Nutzung der Methode des HPLC – basierenden Auffindens aktiver Naturstoffe geeignet ist. Auch beim Vorliegen von aktiven Minorkomponenten lässt sich die in einem vorherigen Test gefundene Bioaktivität eines Substanzgemisches wiederfinden und zuordnen.

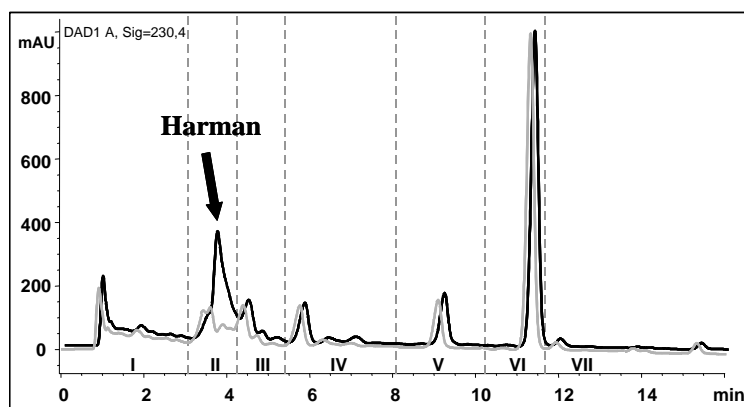
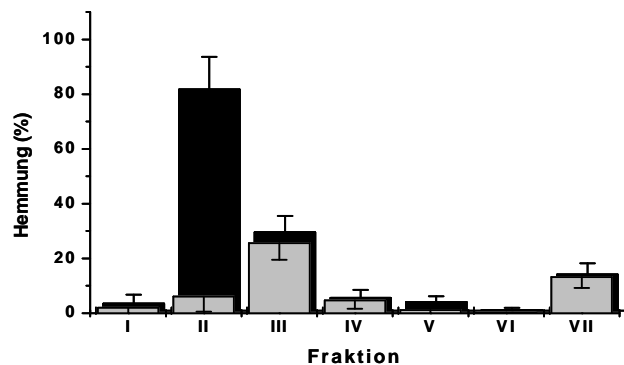


Abb. 3.20. *Matricariae flos*:

Aktivitätsprofil und

HPLC – Chromatogramm
des reinen Extraktes (grau)

und

des Extraktes + 0,5 % Harman
(schwarz)

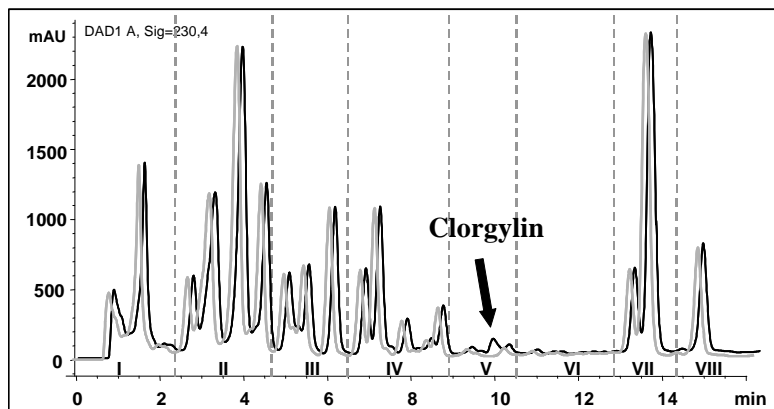
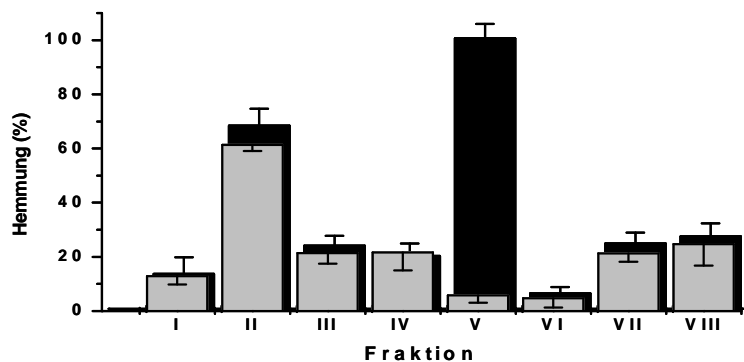


Abb. 3.21. *Angelicae radix*:

Aktivitätsprofil und

HPLC – Chromatogramm
des reinen Extraktes (grau)

und

des Extraktes + 0,5 %
Clorgylin (schwarz)

3.5.2. Mikrofraktionierung des Dichlormethanextraktes von *Salviae miltiorrhizae radix*

Um die Ergebnisse der Mikrofraktionierung für den ersten Monoaminoxidase – Test auf ihre Richtigkeit zu überprüfen, wurden erneut 800 µg Dichlormethanextrakt, nach Auftrennung mittels analytischer HPLC, fraktioniert (Kap. 2.11.3.1.) und die gewonnenen Fraktionen im neu entwickelten Assay (Kap. 2.10.) getestet.

Nach Auswertung der Hemmdaten (Abb. 3.22.) für die einzelnen Fraktionen bestätigte sich das Ergebnis dahingehend, dass ein relativ ähnliches Profil vorlag in dem die Fraktion VI eine verhältnismäßig hohe und die Fraktion XII dagegen eine niedrige Aktivität aufweist. Allerdings sind einige Hemmwerte im Vergleich der Fraktionen untereinander verschoben, d.h. zum Beispiel im Falle der Fraktion VIII im ersten Test keine und im zweiten eine mittlere Aktivität. Diese Tatsache lässt sich wahrscheinlich durch die vorliegenden Fehlerquellen des ersten Testes begründen.

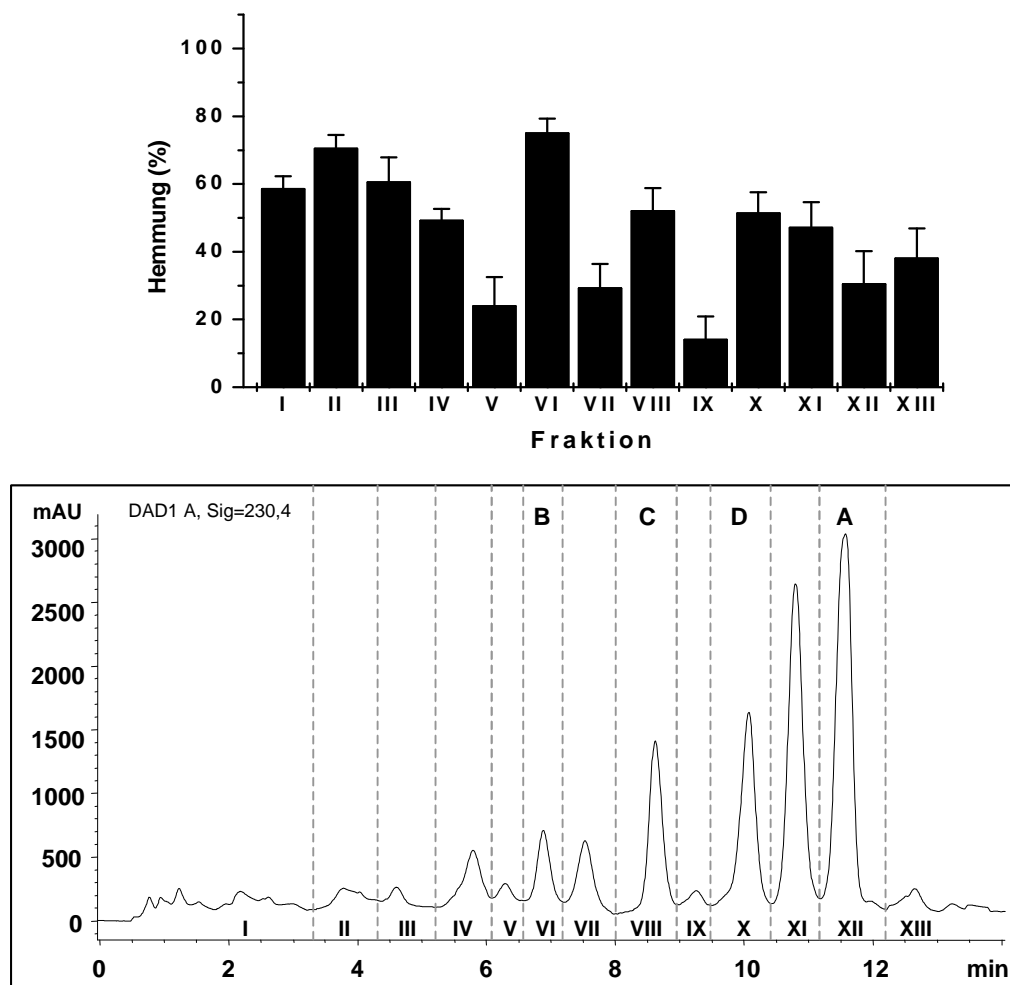


Abb. 3.22. *Salviae miltiorrhizae radix*: Aktivitätsprofil und HPLC – Chromatogramm

3.5.3. Testung der Tanshinone

Nach Zuordnung der Aktivitäten der Mikrofraktionen zum HPLC – Fingerprint wurden die bereits isolierten Reinsubstanzen im zweiten Assay (Kap. 2.10.) getestet.

Nach Auftragen der Hemmkurven und Bestimmung der IC_{50} – Werte konnte gezeigt werden, dass Dihydrotanshinon I mit einem IC_{50} – Wert von 23 μM , wie schon im ersten Test (Abb. 3.6.) und auch nach Testung der Mikrofraktionen im zweiten Assay (Abb. 3.22.) ersichtlich, die aktivste der isolierten Verbindungen darstellt (Abb. 3.23.). Tanshinon I ($IC_{50} = 80 \mu M$) und Cryptotanshinon ($IC_{50} = 84 \mu M$) besitzen eine geringere Aktivität mit einander ähnlichen IC_{50} – Werten und Tanshinon IIA stellt die am wenigsten aktive Verbindung der getesteten Tanshinone dar, was auch aus dem Profil der Mikrofraktionen (Abb. 3.22.) zu erkennen ist. Mit Cryptotanshinon und Tanshinon IIA konnte in den geprüften Konzentrationen keine 100 %ige Hemmung der Monoaminoxidase A erreicht werden.

Auch diese Resultate bestätigen die Eignung des Testes zur Identifizierung von Inhibitoren der Monoaminoxidase A aus komplexen Substanzgemischen, auch wenn es sich wie im Falle von Dihydrotanshinon I nicht um die Hauptverbindung des Extraktes handelt, sondern eher um einen geringer konzentrierten Bestandteil.

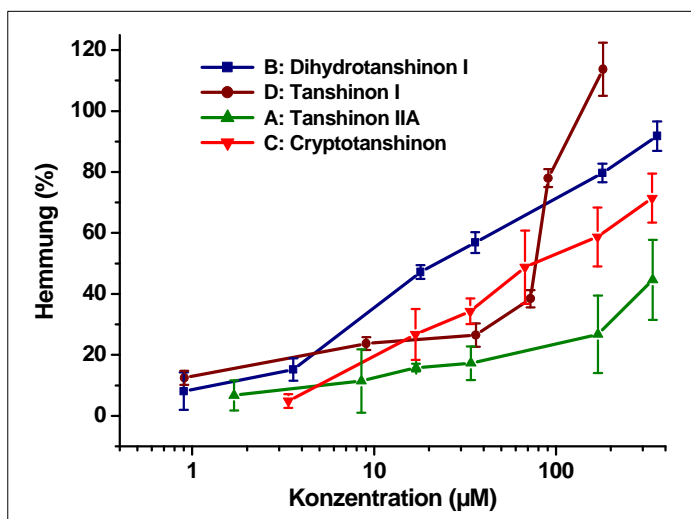


Abb. 3.23. Hemmkurven der Tanshinone

3.6. Weitere Bioaktivitäten von *Salvia miltiorrhiza*

Aufgrund der bereits bekannten vielfältigen pharmakologischen Aktivitäten der Inhaltsstoffe von *Salvia miltiorrhiza* (Kap. 1.5.) sollten weitere Testungen in Systemen auf dem Gebiet der Krebsforschung erfolgen. Dazu wurde eine Mikrofraktionierung des Dichlormethanextraktes von *Salvia* (Kap. 2.11.3.2.) durchgeführt und die gewonnenen Fraktionen im Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg getestet. Als Testsysteme wurden eingesetzt: die Prüfung auf Induktion der Chinon – Reduktase, Cytochrom P4501A – Hemmung und Inhibition der induzierbaren Stickoxidsynthase. Aus den Aktivitätsprofilen konnte anschließend in Korrelation mit dem HPLC – Chromatogramm eine Zuordnung der Aktivitäten zu einzelnen Substanzpeaks erfolgen.

Aus den drei Assays wurde nach Auswertung der Aktivitätsprofile die Testung auf Hemmung der induzierbaren Stickoxidsynthase ausgewählt und zur Bestimmung der IC₅₀ – Werte Reinsubstanzen für die Prüfung zur Verfügung gestellt.

3.6.1. Hemmung der induzierbaren NO – Synthetase (iNOS)

Aktivitätsprofil des Gesamtextraktes nach Mikrofraktionierung

Aus dem Aktivitätsprofil für die iNOS – Hemmung (Abb. 3.24.) waren sechs Aktivitätsbereiche zu erkennen, wobei die bei 8,9 min dem Cryptotanshinon und bei 10,5 min dem Tanshinon I entsprachen. Die anderen Aktivitäten konnten keinen genauen Strukturen zugeordnet werden.

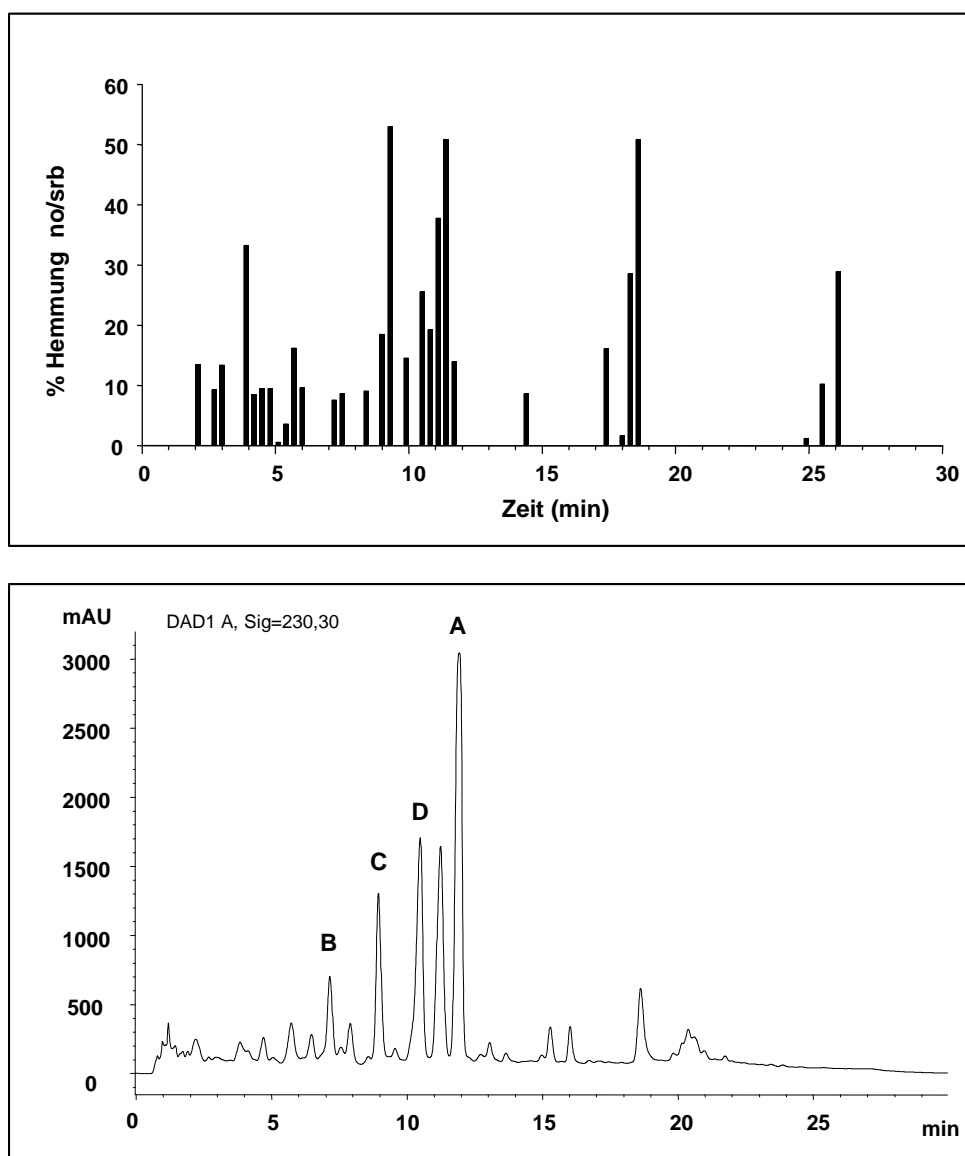


Abb. 3.24. Aktivitätsprofil im iNOS – Test und HPLC – Chromatogramm des Dichlormethanextraktes von *Salvia miltiorrhiza*

Testung isolierter Verbindungen

Nach Zuordnung der Aktivitäten zu den entsprechenden Peaks im HPLC – Chromatogramm der Mikrofraktionierung erfolgte eine Testung der Reinsubstanzen auf ihre Hemmaktivität gegenüber der induzierbaren Stickoxidsynthase.

Dihydrotanshinon I zeigt auch in diesem Test den niedrigsten IC_{50} – Wert mit $2,06 \mu M$. Allerdings wirkt die Substanz ab einer Testkonzentration von $6,3 \mu M$ toxisch auf die Zellen im Bioassay, wodurch das Ergebnis relativiert wird. Cryptotanshinon weist einen IC_{50} – Wert von $7,41 \mu M$ auf. Mit diesem Wert im niedrigen mikromolaren Bereich und einer geringen Zytotoxizität ($IC_{50} \text{ Tox} > 50 \mu M$) besitzt diese Substanz sehr gute Hemmeigenschaften. Tanshinon I besitzt ähnliche Eigenschaften. Der IC_{50} – Wert liegt bei $13,54 \mu M$ und die Substanz hat ebenfalls eine geringere Toxizität ($IC_{50} \text{ Tox} > 50 \mu M$) gegenüber den Zellen im Testsystem. Allerdings kann mit dieser Verbindung keine 100 %ige Hemmung erreicht werden. Für Tanshinon IIA lässt sich ähnlich wie im MAO – Test kein IC_{50} – Wert ermitteln. Die Substanz zeigt damit keine relevanten inhibierenden Eigenschaften gegenüber der induzierbaren Stickoxidsynthase.

Diese Ergebnisse bestätigten eindeutig das Aktivitätsprofil der Mikrofraktionierung, wo Cryptotanshinon als die aktivste Verbindung, gefolgt von Tanshinon I und Dihydrotanshinon I, identifiziert werden konnte. Tanshinon IIA zeigte auch hier keinerlei Aktivität.

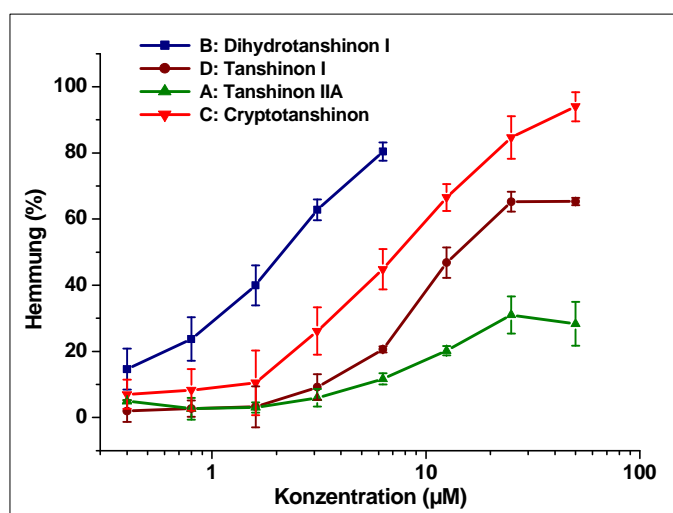


Abb. 3.25. Hemmkurven der Tanshinone im iNOS – Test

4. Diskussion

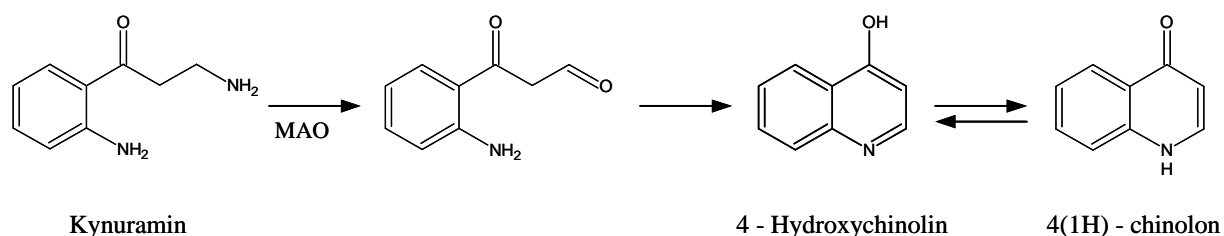
Wie bereits dargelegt, war es Ziel der vorliegenden Arbeit, *Salviae miltiorrhizae radix* hinsichtlich der inhibierenden Eigenschaften gegenüber der Monoaminoxidase, als neue Bioaktivität der Droge, genauer zu charakterisieren.

Der ursprüngliche in der Arbeitsgruppe bestehende Assay zur Identifizierung von Hemmern der Monoaminoxidase war ein im Mikrotiterplattenmaßstab durchgeführter Test, der auf dem Prinzip einer Peroxidase gekoppelten Reaktion beruht (Holt et al., 1997). Grundlage dieser Methode ist, dass Wasserstoffperoxid, welches im Rahmen des Abbaus von Aminen durch die Monoaminoxidase in äquimolaren Mengen gebildet wird, in einer zweiten sich anschließenden enzymatischen Reaktion mit chromogenen Substanzen (Vanillinsäure und 4 – Aminoantipyrin) zu einem farbigen Produkt reagiert. Die Extinktion dieses Reaktionsproduktes wurde über einen bestimmten Zeitraum in vorgegebenen Zeitabständen gemessen und die erhaltene Extinktionsänderung pro Zeit als Maß für die Enzymaktivität gesetzt. Je höher die Änderung der Absorption pro Zeit ist, umso größer ist die Enzymaktivität und damit im Umkehrschluss um so kleiner die Hemmaktivität des geprüften Extraktes oder der geprüften Reinsubstanz. Als Enzymquelle wurde die Mitochondrienfraktion einer Rattenleberpräparation verwendet.

Die genaue Analyse des Assays machte die entscheidenden Nachteile deutlich. Zum einen wird die Enzymaktivität nicht direkt, sondern indirekt über eine nachgeschaltete Reaktion bestimmt, wodurch sich die Zahl der möglichen Einflussfaktoren erhöht. Zum anderen ist der Test nur für die Prüfung von Reinsubstanzen geeignet, die keine antioxidativen Eigenschaften aufweisen. Das Screening von Extrakten, in denen häufig Komponenten vorliegen, die ein niedrigeres Redoxpotential als 4 – Aminoantipyrin haben, dadurch als Protonendonatoren wirken und so das vorhandene Wasserstoffperoxid „abfangen“ können, führt dagegen zu falsch positiven Ergebnissen. Auch die in Extrakten oftmals enthaltenen phenolischen Verbindungen stören die Reaktion, weil diese mit der oxidierten Form des 4 – Aminoantipyrin zu gefärbten Strukturen reagieren können (Schmidt et al., 2003).

Aufgrund dieser bestehenden Nachteile sollte ein Testsystem entwickelt werden, welches auch für das Screening von komplexen Extrakten geeignet ist. Als Enzymgrundlage sollte weiterhin die Mitochondrienfraktion aus einer Rattenleberpräparation genutzt werden. Die Gewinnung von Mitochondrien aus der Leber von Ratten als Enzymquelle für die beiden

Isoenzyme MAO A und B stellt eine einfache und sehr häufig genutzte Möglichkeit dar (Youdim und Sourkes, 1966; Stadt et al., 1982). Als Meßmethoden kamen photometrische, fluorimetrische oder radiometrische Verfahren in Frage. Radiochemische Assays sind wegen ihrer Einfachheit und hohen Sensitivität sehr verbreitet (Wurtman und Axelrod, 1963; Otsuka und Kobayashi, 1964; Tipton, 1985; Da Prada, 1989). Allerdings ist ihre Durchführung aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit radioaktiv markierter Substrate und ihrer erheblichen Sicherheitsanforderungen im Umgang mit Radioisotopen und Lösungsmitteln stark eingeschränkt (Bartolini et al., 1999). Um diese Problematik zu umgehen, wurde nach einem Verfahren zur photometrischen oder fluorimetrischen Bestimmung der Enzymaktivität gesucht. Die fluorimetrischen Messmethoden zeigen ebenfalls eine gute Sensitivität und Spezifität, sind aber durch die Möglichkeit der Fluoreszenzabschwächung durch Testbestandteile eingeschränkt (Bartolini et al., 1999). Dies lässt sich insbesondere bei der Prüfung von Extrakten nicht ausschließen. Außerdem handelt es sich bei den meisten fluorimetrischen Bestimmungen um indirekte Assays, d.h. mit einer nachgeschalteten Reaktion, die zu einem fluoreszierenden Produkt führt (Tipton und Singer, 1993; Morinan und Garratt, 1985). Photometrische Verfahren sind als direkte Bioassays durchführbar, zeigen aber nicht immer eine sehr hohe Sensitivität. Nach Abwägen der Vor – und Nachteile wurde als Verfahren die photometrische Bestimmung der Enzymaktivität ausgewählt. Dazu war es nötig ein geeignetes Substrat zu finden, das selbst oder dessen Reaktionsprodukt entweder im sichtbaren oder im höherwelligen UV – Bereich absorbiert. Außerdem musste es sich um eine Verbindung handeln, die sowohl von MAO A als auch von MAO B umgesetzt wird. Nach Prüfung verschiedener Amine stellte sich Kynuramin als das am besten geeignete Substrat heraus. Kynuramin wird durch die Monoaminoxidase zu einem Aldehyd deaminiert, welcher spontan zu 4 – Hydroxychinolin bzw. 4(1H) – chinolon zyklisiert (Weissbach et al., 1960).



Das Substrat weist im Testpuffer (Sörensen – Phosphatpuffer) ein Absorptionsmaximum bei 360 nm auf, während das Reaktionsprodukt bei dieser Wellenlänge keine Extinktion zeigt. Dessen Maximum liegt im gleichen Puffersystem bei 315 nm. Aufgrund der geringeren Störmöglichkeiten im höherwelligen UV – Bereich wurde 360 nm als Messwellenlänge

ausgewählt und damit die Extinktionsabnahme, d.h. die Konzentrationsabnahme des Substrates, pro Zeit als Maß für die Enzymaktivität gesetzt. Bereits bestehende Testprotokolle (Weissbach et al., 1960; Thull et al., 1993) wurden als Grundlage für die Entwicklung eines kontinuierlichen, spektrophotometrischen und im Mikrotiterplattenmaßstab durchführbaren Bioassay genutzt. Mit diesem Test (Monoaminoxidase – Test I) war es möglich, sowohl Reinsubstanzen als auch Extrakte auf ihre inhibierenden Eigenschaften gegenüber den Monoaminoxidasen A und B zu prüfen.

In einem Screening von 20 Pilz – (Schmidt et al., 2003) und 13 Pflanzenextrakten [*Salvia miltiorrhiza* Wurzel : CH₂Cl₂, MeOH; *Salvia sp.* (Panama) Gesamtpflanze: CH₂Cl₂, MeOH; *Cimicifuga racemosa* Rhizom: CH₂Cl₂, BuOH, MeOH, *Palicourea guianensis* Wurzel, Zweige, Stamm: CH₂Cl₂, MeOH] fiel als aktiver Extrakt der Dichlormethanextrakt von *Salviae miltiorrhizae radix* auf. Der Methanolextrakt der Droge hingegen zeigte keinerlei Aktivität. Aus diesem Resultat konnten als aktive Verbindungen die Tanshinone vermutet werden. Diese Strukturen weisen einen eher lipophilen Charakter auf, während die phenolischen Komponenten hydrophiler Natur sind. Die Tatsache, dass es sich um lipophile Moleküle als Hemmer der Monoaminoxidase handelt, stellt im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Anwendung einen positiven Aspekt dar. Um ihre Wirkung insbesondere im ZNS entfalten zu können, ist bekanntlich eine Überwindung der Blut – Hirnschranke nötig. Diese kann aber nur von Ionen, niedermolekularen Stoffen und lipophilen Verbindungen passiert werden. Lipophile Inhibitoren der Monoaminoxidase haben demzufolge als denkbare Leitstrukturen ein höheres Potential als hydrophile. Damit stellte dieses Ergebnis eine sehr gute Grundlage für die weiteren Untersuchungen dar.

Neben dem Dichlormethanextrakt wurden auch zwei SFE – Extrakte der Droge geprüft. Damit sollte das am besten geeignete Extraktionsverfahren für die Tanshinone gefunden werden. Die Hemmdaten waren miteinander vergleichbar. Der Lösungsmittelextrakt zeigte aber trotz übereinstimmendem HPLC – Chromatogramm etwas höhere Aktivitäten. Aufgrund dieses Ergebnisses und der Tatsache, dass mit der Perkolation größere Extraktmengen gewonnen werden konnten, wurde dieses Extraktionsverfahren ausgewählt.

Die wiederholte Prüfung des Dichlormethanextraktes auf seine Hemmaktivität gegenüber der Gesamtmonoaminoxidase (MAO A und B) zeigte, dass auch bei hohen Konzentrationen keine 100 %ige Hemmung vorlag, was auf eine selektive Inhibition eines der beiden Isoenzyme hindeutete. Die anschließende Testung auf Selektivität ergab eine eindeutige Präferenz gegenüber der Monoaminoxidase A. Dieses Resultat bestätigte sich auch nach der Testung

der mit Hilfe der HPLC – basierende Mikrofraktionierung gewonnenen Fraktionen. Auch hier zeigte sich eine eindeutige Selektivität gegenüber der Monoaminoxidase A. Hinsichtlich des möglichen therapeutischen Einsatzes reduziert sich dadurch die Anwendung als Inhibitoren der Monoaminoxidase A auf die Therapie von verschiedenen Formen der Depression.

Aufgrund der Korrelationsmöglichkeit des Aktivitätsprofils der Mikrofraktionen mit dem Chromatogramm der HPLC – Trennung konnten die Aktivitäten einzelnen Peaks zugeordnet werden. Nach Vergleich mit den Chromatogrammen der durch präparative Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen, erfolgte eine gezielte Aufreinigung zur Isolierung von sowohl aktiven als auch inaktiven Verbindungen.

Die isolierten Reinsubstanzen wurden nach ihrer strukturellen Charakterisierung auf ihre Hemmaktivität geprüft, wobei jede Verbindung mehrfach getestet und jeder einzelne Test als Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

Die Testresultate zeigten sehr starke Standardabweichungen fast aller Messwerte. Es traten innerhalb eines einzelnen Testes und auch zwischen den Tests einer Substanz sehr große Wertedifferenzen auf. Nach Ausschluss experimenteller Fehler, wie z. B. Pipetierunregelmäßigkeiten, ungenügende Durchmischung der Proben oder Zeitverzögerungen, kam als Ursache für die beobachteten Abweichungen nur die Tatsache in Frage, dass es sich bei der enzymatischen „Lösung“ um eine Suspension handelte. Deren vorliegende Trübung führte zu Fehlern in der photometrischen Bestimmung im UV – Bereich. Damit war dieser Assay hinsichtlich seiner Bestimmungsmethode zwar weniger anfällig als der ursprüngliche Test, da sowohl Extrakte als auch Reinsubstanzen unabhängig ihrer Struktur geprüft werden konnten. Für die zuverlässige Ergebnisfindung war er aber aufgrund der starken Werteschwankungen nicht geeignet.

Aufbauend auf diesem Ergebnis und der durch den Test ermittelten Selektivität der Tanshinone gegenüber MAO A sollte ein Bioassay zur Identifizierung von Inhibitoren der Monoaminoxidase A unter Verwendung rekombinanter humaner MAO A entwickelt werden. Ziel des Vorhabens war es, MAO A in ausreichender Menge und Aktivität und guter Stabilität für den Aufbau eines neuen Testsystems zu gewinnen. Als Expressionssystem wurde der eukaryotische Organismus *Saccharomyces cerevisiae* ausgewählt. Die Anwendung von *E.coli*, als ein prokaryotischer Mikroorganismus, stellte nur eine mögliche zweite Wahl dar, da bisherige Versuche zur Gewinnung einer funktionellen MAO A nicht erfolgreich verlaufen waren (Bach et al., 1988). Um abschließende Aufreinigungsschritte zu erleichtern, wurde das Enzym als GST – Fusionsprotein konstruiert. Dazu wurde der Vektor pEG-KT verwendet,

der über die in Kapitel 3.3. angegebenen Eigenschaften verfügt. Nach erfolgreicher Klonierung, die durch Kontrollverdaus und anschließende Gelelektrophorese und Sequenzierung des gewonnenen Plasmids, überprüft wurde, erfolgte die Transformation in *S. cerevisiae* und die Fermentation der transformierten Hefezellen. Für die Bildung des Proteins wurde die Möglichkeit der Induktion durch Galactose als Kohlenstoffquelle genutzt. Dies erfolgte in der 3. Phase der Fermentation, der Induktionsphase, durch den Zusatz einer konzentrierten Galactoselösung zum Fermentationsansatz nach vollständigem Verbrauch der Glucose.

Das Fusionsprotein wurde als mitochondriales Membranprotein exprimiert. Nach Abtrennung der Mitochondrien von anderen Zellbestandteilen durch verschiedene Zentrifugationsschritte, erfolgte die weitere Isolierung der Proteine, wie Extraktion aus der Mitochondrienmembran, Präzipitation und Dialyse. Aus dem erhaltenen Dialysat sollte anschließend durch Adsorption an eine Gelmatrix das Fusionsprotein gebunden und nach mehreren Waschschritten abgelöst werden. Auf diese Weise war eine Trennung von anderen Proteinen möglich. Die Analyse der gewonnenen Eluate zeigte aber, dass das Fusionsprotein während der Aufreinigungsschritte z. T. in seine Komponenten, d.h. in freie MAO A (65 kDa) und abgespaltenes GST (29 kDa), zerfallen war. Außerdem konnte keine reproduzierbare Aktivität gefunden werden. Um zu klären, an welcher Stelle der Aufreinigung die Aktivitätseinbuße eintrat, wurden alle Aufreinigungsstufen geprüft. Es konnte gezeigt werden, dass bis einschließlich zum Dialysat nachweisbare Aktivitäten vorlagen, d.h. dass im letzten Schritt der Aktivitätsverlust zu Stande gekommen sein musste.

Die eigentliche Ursache und die mögliche Lösung dieses Problems konnte auch aus dem Vergleich mit anderen Arbeiten nicht gefunden werden. Die Klonierung von Enzymen als GST – Fusionsproteine an sich stellt eine einfache und häufig genutzte Methode zur Gewinnung von Enzymen dar (Mitchell et al., 1993). Im Falle von MAO A existieren allerdings nur Arbeiten zur Darstellung des „reinen“ Enzyms. Urban et al. (1991) verwendeten z. B. den gleichen Klon HM 11. Zur Charakterisierung setzten sie aber die Mitochondrienfraktion ein und reinigten damit nicht vollständig auf. In anderen Arbeiten von Weyler et al. (1990) und Li et al. (2002) war die Klonierung und Aufreinigung von MAO A, ebenfalls nicht als Fusionsprotein, zu einem funktionsfähigem Enzym erfolgreich. Allerdings beschrieb Li eine geringere Proteinausbeute im Vergleich zur Expression in *Pichia pastoris*.

Um aber trotzdem die erfolgreiche Klonierung und Überexpremierung von MAO A zu zeigen und dass Enzym zum Aufbau eines neuen Testsystem nutzen zu können, wurde für die weiteren Arbeiten das Dialysat verwendet. Zunächst erfolgte eine Charakterisierung des

Proteins hinsichtlich der kinetischen Eigenschaften, der selektiven Hemmung durch Clorgylin und der Temperaturstabilität. Die erhaltenen Resultate wurden sowohl mit Literaturdaten von klonierter als auch von aus verschiedenen Geweben isolierter MAO A verglichen. Der Vergleich bestätigte eindeutig die Übereinstimmung der ermittelten Daten mit den Literaturangaben.

Damit war es gelungen, ein voll funktionsfähiges und ausreichend stabiles Enzym zu gewinnen. Die Aktivität des enzymhaltigen Dialysats war etwa 2 mal höher als die der Rattenlebermitochondrien. Außerdem zeigte die Enzymlösung keinerlei Trübung, die sich auf eine photometrische Messung negativ auswirkt. Im Unterschied zu tierischen Mitochondrienpräparationen kann man auf diese Weise zum einen die Isoenzyme getrennt voneinander und zum anderen in gleichbleibender Aktivität gewinnen.

In Anlehnung an den Monoaminoxidase – Test I wurde unter Nutzung des Dialysates ein neuer Assay entwickelt (Monoaminoxidase – Test II). Dieser sollte für das HPLC – basierte Auffinden von Inhibitoren der MAO A genauso anwendbar sein, wie für die Testung der isolierten Reinsubstanzen. Aufbauend auf den Test I wurden das gleiche Puffersystem und das gleiche Substrat Kynuramin verwendet. Die Konzentration des Amins wurde unter Berücksichtigung eines linearen Stoffumsatzes auf einen geeigneten Wert eingestellt. Um während der Inkubations – und Messphasen keine Aktivitätsverluste des Enzyms vorliegen zu haben, wurden die Temperatur auf 30 °C und die Dauer der Inkubation und der Messung reduziert. Im abgeänderten Messzeitraum von 10 Minuten konnte ein linearer Umsatz des Substrates gesichert werden. Die Inkubation von 5 Minuten war für eine Inhibition des Enzyms ausreichend. Die Tests wurden, wie auch vorher, als Dreifachbestimmungen durchgeführt und jeweils mehrfach wiederholt. Die eingesetzte Enzymmenge wurde über die Proteinkonzentration so reguliert, dass sich eine Volumenaktivität von 2,55 U/l ergab und die Absorptionswerte in angemessenen Bereichen lagen. Mit dieser Aktivität konnten reproduzierbare Ergebnisse von schwachen und auch starken Inhibitoren erzielt werden.

Auf diese Weise war ein quantitativer, spektrophotometrischer, kontinuierlicher und im Mikrotiterplattenmaßstab durchführbarer Assay entwickelt worden.

Im Unterschied zum Peroxidase gekoppelten Bioassay, in dem die gebildete H_2O_2 – Menge als Maß für die Enzymaktivität bestimmt wird (Holt et al., 1997), handelt es sich hierbei um eine direkte Bestimmungsmethode, ohne nachgeschaltete Reaktionen. Außerdem kann es nicht zu falsch positiven Ergebnissen durch das Vorhandensein antioxidativ wirksamer Bestandteile kommen. Des weiteren können mit diesem Assay auch gefärbte Extrakte, wie sie

im Falle von *Salvia miltiorrhiza* vorliegen, geprüft werden, da hier keine Einpunktmessung gegen einen meist schwierig zu fassenden Blankwert erfolgt. In diesem Test wird die Enzymaktivität mittels einer Mehrpunktmessung als Extinktionsänderung pro Zeit ermittelt. Dieser berechnete Anstieg ist unabhängig von der Grundfärbung des Ansatzes, da sich die Konzentration der gefärbten Verbindungen während der Reaktion nicht verändert. Die Durchführung des Bioassays im Mikrotiterplattenformat verringert zudem den Material – und Zeitaufwand gegenüber Tests im Milliliteransatz. Ein weiterer entscheidender Vorteil des Testsystems ist der Einsatz einer enzymhaltigen Lösung, die keinerlei Turbidität aufweist und damit die photometrische Messung im UV – Bereich nicht beeinflusst. Mit diesem Enzymansatz liegt eine Enzymquelle mit guter und reproduzierbarer Aktivität und akzeptabler Stabilität vor, deren Proteinkonzentration nahezu direkt mit der Enzymkonzentration korreliert. Die spektrophotometrische Messmethode zur Ermittlung der Enzymaktivität stellt im Vergleich zu Fluoreszenzmessungen oder gar radiochemischen Auswertemethoden ein leichtes und ohne großen Aufwand durchführbares Verfahren dar.

Mit diesem Testsystem war damit ohne Komplikationen eine Prüfung von komplexen Extrakten und Reinsubstanzen auf ihre Hemmaktivität gegenüber der Monoaminoxidase A möglich. Die gesamten erhaltenen Resultate stellten reproduzierbare Ergebnisse dar.

Um die Eignung des entwickelten Assays für die Methode des HPLC – basierten Auffindens von biologisch aktiven Verbindungen zu zeigen, wurden zwei lipophilen (CH_2Cl_2) Drogenextrakten bekannte Inhibitoren der Monoaminoxidase A zugesetzt. Während der chromatographischen Auftrennung der reinen und der modifizierten Extrakte mittels analytischer HPLC, erfolgte eine parallele Mikrofraktionierung der Eluate. Die Mikrofraktionen wurden anschließend im Bioassay getestet und das erhaltene Aktivitätsprofil zum dazugehörigen HPLC – Chromatogramm in Beziehung gesetzt. Als Drogen wurden *Matricariae flos* und *Angelicae radix* ausgewählt. Kamillenblüten werden auf Grund ihrer antiphlogistischen, spasmolytischen und antimikrobiellen Eigenschaften in topischen und oralen Zubereitungen eingesetzt. Inhaltsstoffe der Blüten sind lipophile Sesquiterpene, Polyacetylene und Flavonoide (Teuscher, 1997). Angelicawurzel wird hauptsächlich als appetit – und verdauungsanregende Droge verwendet. Als Inhaltsstoffe findet man Cumarine, Furanocumarine und Phenylpropankörper, wie z. B. Kaffeesäurederivate (Teuscher, 1997). Von beiden Arzneidrogen waren keine Monoaminoxidase inhibierenden Eigenschaften oder andere relevante ZNS – Aktivitäten bekannt. Als Inhibitor der Monoaminoxidase A wurden dem Kamillenblütenextrakt 0,5 % Harman, ein β – Carbolin – Alkaloid (Rommelspacher et

al., 1994), und dem Angelicawurzelextrakt 0,5 % Clorgylin zugesetzt. Durch die Korrelation der Aktivitätsprofile mit den HPLC – Chromatogrammen erfolgte eine Zuordnung der Aktivitäten zu den einzelnen Peaks.

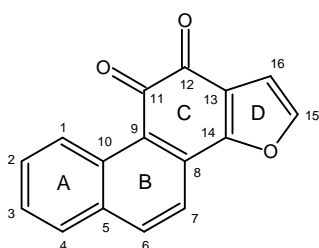
Es zeigte sich aus dem Vergleich der reinen mit den modifizierten Extrakten eine deutliche Zunahme der Aktivität in den modifizierten Extrakten und zwar ausschließlich in der dem Inhibitor entsprechenden Fraktion. Die Aktivitäten der anderen Fraktionen veränderten sich hingegen durch den Zusatz des Hemmers nicht.

Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass mit Hilfe des Bioassays Aktivitäten in komplexen Gemischen wiedergefunden und zugeordnet werden können. Auch beim Vorliegen von Minorkomponenten kann eindeutig eine Zuordnung der Aktivität erfolgen.

Die Methode des HPLC – basierten Auffindens aktiver Substanzen kann demnach mit dem neu entwickelten Testsystem für das Screening von Extrakten kombiniert werden. Auf diese Weise kann nach einem geringen Arbeitsaufwand sehr schnell und sicher entschieden werden, ob die präparative Aufreinigung eines potentiell aktiven Extraktes sinnvoll ist oder nicht. Das heißt, es sind keine aufwendigen präparativen Aufreinigungsschritte und die Testung jeder einzelnen Stufe notwendig, um Informationen über die Art der aktiven Substanz zu erhalten. Es reicht eine Kopplung der HPLC – Trennung mit einer Mikrofraktionierung und paralleler Aufnahme spektroskopischer Daten wie UV/Vis – Spektren oder MS – Signale. Aus diesen Daten und dem Aktivitätsprofil der Mikrofraktionen sind schon eine Vielzahl möglicher Substanzcharakteristika bestimmbar.

Mit Hilfe des neu entwickelten Testes sollte auch eine genaue Charakterisierung von *Salvia miltiorrhiza* bezüglich der beobachteten Inhibition von MAO A erfolgen.

Im ersten Test offenbarte sich bereits, dass Dihydrotanshinon I wahrscheinlich die aktivste der isolierten Substanzen ist und dass eindeutig eine Selektivität gegenüber MAO A vorliegt. Außerdem zeigte sich nach Vergleich der Strukturen, dass hinsichtlich der strukturellen Voraussetzungen für eine Hemmaktivität vermutlich ein ungesättigter Ring A vorliegen muss. Diese strukturelle Eigenschaft ist bei Dihydrotanshinon I und bei Tanshinon I gegeben, während Tanshinon IIA und Cryptotanshinon einen gesättigten Ring A besitzen.



Für die Charakterisierung der inhibierenden Eigenschaften von *Salviae miltiorrhizae radix* im Monoaminoxidase – Test II wurde zunächst die Mikrofraktionierung wiederholt und die gewonnenen Fraktionen getestet. Das erhaltene Aktivitätsprofil war dem des ersten Testes relativ ähnlich. Unter Beachtung der unterschiedlichen Konzentrationen der Verbindungen im Extrakt, konnte die Fraktion VI als die mit der höchsten Aktivität identifiziert werden. Die Fraktion XII, die dem Tanshinon IIA als Hauptkomponente des Extraktes entspricht, weist hingegen nur eine sehr geringe Aktivität auf. Einander vergleichbare Hemmeigenschaften findet man, ebenfalls unter Berücksichtigung des Gehaltes, bei den Fraktionen VIII und X.

Nach der Aufnahme des Aktivitätsprofils der Mikrofraktionen wurden die isolierten Tanshinone getestet. Ziel war es zum einen, Konzentrations – / Wirkungskurven aufzunehmen und IC_{50} – Werte zu bestimmen und zum anderen, die Ergebnisse der Mikrofraktionen zu überprüfen.

Die erhaltenen Resultate bekräftigten deutlich das Ergebnis des HPLC – Aktivitätsprofilings. Dihydrotanshinon I (entspricht der Mikrofraktion VI) stellt die aktivste der isolierten Verbindungen dar. Mit einem IC_{50} – Wert im mikromolaren Bereich gehört das Molekül damit zu den recht wirksamen MAO A – Hemmern aus der Gruppe der Naturstoffe. Tanshinon I und Cryptotanshinon haben zwar ähnliche IC_{50} – Werte, mit Cryptotanshinon konnte aber keine 100 %ige Inhibition des Enzyms erreicht werden. Tanshinon IIA bestätigte ebenfalls das Aktivitätsprofil. Diese Verbindung ist zum einen die inaktivste der getesteten Tanshinone und zum anderen lässt sich für Tanshinon IIA kein IC_{50} – Wert ermitteln.

Die Ergebnisse bewiesen zudem die nach dem Test I aufgestellte Hypothese über die strukturellen Voraussetzungen für eine Hemmaktivität.

Die Hemmkurven aller vier Verbindungen zeigten im Vergleich zum Monoaminoxidase – Test I deutlich kleinere Standardabweichungen. Damit besitzen diese Ergebnisse eine wesentlich größere Aussagekraft als die des vorherigen Bioassays.

Der Monoaminoxidase – Test II stellt, zusammenfassend betrachtet, einen sehr gut geeigneten Bioassay zur Identifizierung von Inhibitoren der Monoaminoxidase A dar. Er zeichnet sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und durch die Möglichkeit der Testung von Extrakten und Reinsubstanzen aus. Diese Aussage konnte sowohl durch die Testung von gespikten und reinen Extrakten, als auch durch die Identifizierung von Tanshinonen aus *Salvia miltiorrhiza* als Inhibitoren des Enzyms bestätigt werden.

Die Tanshinone stellen dabei als Diterpene eine neue Klasse von MAO – Inhibitoren mit offensichtlicher Struktur – und Wirkungsbeziehung dar. Bereits isolierte und charakterisierte Hemmer natürlichen Ursprungs sind z. B. Xanthone (Suzuki et al., 1981; Gnerre et al.,

2001b), Stilbenoide (Han et al., 1990; Zhou et al., 2001), β – Carboline (McKenna et al., 1984), Naphthochinone (Khalil et al., 2000) und Benzopyrane (Gnerre et al., 2001a). Aus dem Vergleich der IC_{50} – Werte der Tanshinone mit z. B. verschiedenen Xanthonderivaten (Gnerre et al., 2001b) kann man die Diterpene als mittelwirksame Naturstoffe bezeichnen. Aufgrund ihres lipophilen Charakters und ihrer recht kleinen Molekülgröße könnten sie als Modellsubstanzen für die Entwicklung stärker wirksamer Inhibitoren der Monoaminoxidase A dienen.

Ihre Wirkung auf die Monoaminoxidase stellt eine neue, bisher noch nicht beschriebene, Bioaktivität von *Salvia miltiorrhiza* dar.

Neben der Untersuchung der inhibierenden Eigenschaften auf die Monoaminoxidase war es weiterhin Inhalt dieser Arbeit, den Dichlormethanextrakt der Droge unter Nutzung des HPLC – Aktivitätsprofilings in Testsystemen zu prüfen, die für entzündliche Prozesse bzw. im Rahmen der Chemoprävention von Krebserkrankungen relevant sind.

Zu diesen Systemen gehörten die Prüfung auf Induktion der Chinon – Reduktase, Hemmung von Cytochrom P4501A (Cyp1A) und Inhibition der induzierbaren Stickoxidsynthase (iNOS) (Gerhäuser et al., 2003). Nach Auswertung der Aktivitätsprofile wurde zur genaueren Charakterisierung der isolierten Reinsubstanzen die Testung auf Inhibition der induzierbaren Stickoxidsynthase ausgewählt. In diesem Bioassay (Heiss et al., 2001) zeigten einige Mikrofraktionen interessante Hemmwerte. In einem tierexperimentellen Versuch (Peigen et al., 1996) war bereits für *Salviae miltiorrhizae radix* eine Herabsetzung des NO – Levels beschrieben worden. Dazu wurde ein Teil der Versuchsratten mit der Droge vorbehandelt, der andere nicht und anschließend bei allen eine Ischämie ausgelöst. Aus dem Vergleich der Stickstoffmonoxid – Konzentrationen konnte eine Herabsetzung auf Normalniveau bei den vorbehandelten Ratten im Vergleich zu unbehandelten Tieren beobachtet werden.

iNOS ist eines der drei Schlüsselenzyme, welche die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus der Aminosäure L – Arginin katalysieren. Die Enzyminduktion kann durch eine Vielzahl von proinflammatorischen Mediatoren wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β), Interferon- γ (IFN- γ) und Lipopolysaccharide (LPS) erfolgen. Das durch die induzierbare Stickoxidsynthase gebildete NO spielt eine bedeutende Rolle bei einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen des Organismus, z. B. bei der Blutdruckregulation, bei Entzündungsreaktionen, im Rahmen von Infektionen und bei der Entstehung und der Progression von malignen Erkrankungen. iNOS hat sich dementsprechend

sowohl als Marker als auch als therapeutisches Target im Rahmen dieser Geschehen etabliert (Lirk et al., 2002).

Aus dem Aktivitätsprofil der iNOS – Hemmung waren u. a. die Fraktionen, die dem Cryptotanshinon und dem Tanshinon I entsprechen, als aktive Bereiche zu erkennen.

Für die vollständige Aufklärung der Aktivitäten wurden alle vier isolierten und strukturell charakterisierten Tanshinone im entsprechenden Testsystem auf ihre iNOS – hemmende Wirkung geprüft. Als vielversprechender Inhibitor konnte Cryptotanshinon mit einem IC_{50} – Wert im niedrigen mikromolaren Bereich (7,41 μM) und einer geringen Toxizität gegenüber den RAW 264.7 – Zellen identifiziert werden. Im Vergleich zur Referenzsubstanz Curcumin (IC_{50} – Wert von 4,5 μM) ist der IC_{50} – Wert des Cryptotanshinon sehr ähnlich, was das hohe Hemmpotential dieser Verbindung deutlich unterstreicht. Die Hemmdaten des Tanshinon I bestätigten genauso wie die Werte von Dihydrotanshinon I und Tanshinon IIA das Aktivitätsprofil der Mikrofraktionierung. Damit konnte auch hier eindeutig der Nutzen der HPLC – basierten Mikrofraktionierung zur Identifizierung biologisch aktiver Verbindungen gezeigt werden.

Die inhibierenden Eigenschaften der Tanshinone, insbesondere des Cryptotanshinon, gegenüber der induzierbaren Stickoxidsynthase stellen eine weitere interessante Bioaktivität der Droge dar. Mit Hemmdaten im mikromolaren Bereich weist Cryptotanshinon im Vergleich zu anderen getesteten Substanzen (Gerhäuser et al., 2003) ein hohes Hemmpotential auf.

5. Summary

In the search for activities on targets involved in degenerative diseases of the central nervous system an ethnobotany based screening of higher plants and entomopathogenic Deuteromycetes (Schmidt et al., 2003) was carried out. The bioassays included functional screens for NMDA antagonistic activity in stably transfected fibroblasts, for neuritogenic activities in PC-12 cells, and tests for monoamine oxidase (MAO) inhibitory and radical scavenging properties.

Danshen, the dried root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, was selected for screening because of its numerous uses and pharmacological properties. Danshen is widely used in Traditional Chinese Medicine for the treatment of coronary heart diseases and other ailments. The phytochemistry and pharmacology of the drug is well studied, and numerous abietane type diterpenoids and phenolic compounds have been characterized (Tang and Eisenbrand, 1992). However, a pronounced bioactivity was only observed in the assay for monoamine oxidase inhibitors. Only the dichloromethane extract showed inhibitory activity. Because of this result the tanshinones were guessed as the active compounds. Up to now there are no information about inhibitory activity against monoamine oxidase.

For MAO activity various assay protocols have been reported. However, published assay protocols generally have been developed for the testing of discrete drug substances. Screening of extracts or other mixtures poses a number of problems related to the nature of these materials. They are usually highly coloured and contain complex mixtures of unknown compounds, some of which may interfere with the detection. Enzyme preparations of MAO A and B have been made mostly from various animal tissues, such as brain, kidney, and beef, pig or rat liver (Salach, 1979; Lu et al., 1996), whereas human placenta has served as a source for MAO A (Weyler und Salach, 1985). Typically, the mitochondrial pellets are used for the assay. These preparations show moderate specific activity, and the turbidity of the preparation negatively affects the accuracy of photometric measurements.

In our initial bioassay for MAO inhibitors we used an assay with a rat mitochondrial preparation, tyramine as substrate and a peroxidase readout (Holt et al., 1997). It was, however, prone to false positive results, because extract constituents with antioxidant activity acted as proton donors in the peroxidase reaction.

A continuous assay with kynuramine as substrate (Weissbach et al., 1960) proved to be more robust in that respect, but the significant turbidity and low specific activity of the mitochondrial preparation rendered the assay unsuitable for HPLC – based activity profiling.

The dichloromethane extract of *Salviae miltiorrhizae radix*, its HPLC – based activity profile and the isolated tanshinones showed distinct MAO A selectivity in the kynuramine assay. But the assay data suffered from variations due to light dispersion in the mitochondrial suspension.

Therefore, an improved assay using recombinant MAO A was developed. *S. cerevisiae* was chosen for the expression of recombinant MAO A. Full enzymatic functionality of the enzyme could be expected in this common eukaryotic system, because of recent reports of MAO expression in yeast cells (Li et al., 2002).

For production of recombinant MAO A we constructed a high – copy plasmid for the inducible overexpression in yeast of MAO A as GST fusion protein. The MAO A coding region from the plasmid HM11 was cloned into the pEG–KT vector which is characterized by a GST coding region, URA3 as a marker for plasmid selection and a galactose inducible promoter.

Production of the enzyme was carried out in a high density fermentation, which was divided into a batch phase, a feed batch phase with a synthetic medium and glucose as carbon source, and the induction phase with galactose as the carbon source. Harvested yeast cells were disrupted, and the mitochondrial fraction containing MAO A activity was separated by ultracentrifugation. MAO A was further purified by extraction with Triton[®] X 100, precipitation with ammonium sulfate and dialysis against Tris/EDTA buffer. Further purification of the GST fusion protein on an affinity column yielded a preparation which showed four distinct bands on SDS – Page with the correct molecular mass for GST – MAO A (94 kDa), MAO A (65 kDa), GST (29 kDa) and yeast GST (26 kDa). The last purification step, however, led to an almost complete loss of enzymatic activity. The dialysate was therefore used for subsequent analyses.

The enzyme behaved comparable to wild – type MAO A with respect to selectivity and K_i values. The activity was approx. 2 fold higher than that of rat liver mitochondrial pellet. In contrast to this preparation, the recombinant MAO A showed no turbidity. To search for inhibitors of MAO A, we established a microtiter based quantitative spectrophotometric assay for continuous measurement of amine metabolism. As enzyme source we used the dialysate with recombinant MAO A.

The suitability of the assay for HPLC – based profiling was validated with spiked plant extracts. In both cases low concentrations of MAO – inhibitors were detected. Reproducibility of data and robustness of the assay were significantly improved in comparison to the liver mitochondrial preparations. Assay interference by strongly coloured extracts was circumvented by a kinetic measurement. The assay was also successfully used in the identification of abietane diterpene quinones from *Salvia miltiorrhiza* as a new class of MAO A inhibitors with structure activity relationship, adding a new facet in the spectrum of bioactivities of this medicinal plant.

For further identification of bioactivities of danshen the dichloromethane extract was tested in test systems which are relevant for potential anti – inflammatory and cancer chemopreventive properties. These systems include assays for induction of quinone reductase (QR) activity, inhibition of inducible NO synthase (iNOS) and inhibition of cytochrome P4501A (Cyp1A) (Gerhäuser et al., 2003). Because of pronounced activities of some fractions in the iNOS assay, this test system was selected for further characterization of the isolated tanshinones. Only cryptotanshinone showed high inhibitory activity against the inducible NO synthase. The IC₅₀ of the compound was in the micromolar range and the substance showed no toxicity against RAW 264.7 murine macrophages in the test system. The inhibition of iNOS demonstrate a further interesting bioactivity of danshen.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AcCN	Acetonitril
ASE	Accelerated Solvent Extraction / beschleunigte Lösungsmittlextraktion
bzw.	beziehungsweise
BuOH	Butanol
ca.	circa
CHCl ₃	Chloroform
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan / Methylenchlorid
CO ₂	Kohlendioxid
d.h.	das heißt
DAD	Diode Array Detector
DC	Dünnschichtchromatogramm bzw. Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI LC – MS	Electrospray Ionisation Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
et al.	et alii / und andere
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
F ₂₅₄	Fluoreszenzindikator 254 nm
Fig.	Figur
GST	Glutathion – S – Transferase
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography / Hochleistungsflüssigchromatographie
HPLC – MS	High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
HClO ₄	Perchlorsäure
IC ₅₀	inhibition concentration (50 %)
i.d.	Innendurchmesser
iNOS	induzierbare Stickoxidsynthase
kDa	Kilo – Dalton

K _m	Michaelis – Menten – Konstante
Kap.	Kapitel
LC – MS	syn. HPLC – MS
LM	Laufmittel
LPLC	Low Pressure Liquid Chromatography
M	molar
MAO	Monoaminoxidase
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MHz	Megahertz
min.	Minute
MS	Mass Spectrometry / Massenspektrometrie bzw. Massenspektrometer
MTP	Mikrotiterplatte
NH ₄ CH ₃ COO	Ammoniumacetat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NO	Stickstoffmonoxid
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PBS	phosphate buffered saline / Phosphat – gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
RP	Reversed Phase / Umkehrphase
RP – HPLC	Reversed Phase – High Performance Liquid Chromatography
RP – LPLC	Reversed Phase – Low Performance Liquid Chromatography
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SC	Säulenchromatographie
SDS	Natrium – Dodecylsulfat
sec.	Sekunde
SFE	Supercritical Fluid Extraction / Extraktion mit überkritischen Gasen
s.o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
t _R	Retentionszeit
UV	ultraviolett
UV / Vis	Ultraviolet / Visible

z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem

7. Literaturverzeichnis

- Abell, C. W. and Kwan, S.- W., **2001**. Molecular characterisation of monoamine oxidases A and B. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, *65*, 129-156.
- Ai, C. B., Li, L. N., **1988**. Stereostructure of salvianolic acid B and isolation of salvianolic acid C from *Salvia miltiorrhiza*. *J. Nat. Prod.*, *51*, 145-149.
- Ai, C. B., Li, L. N., **1991**. Salvianolic acid G, a caffeic acid dimer with a novel tetracyclic skeleton. *Chinese Chemical Letters*, *2*, 17-18.
- Ai, C. B., Li, L. N., **1992**. Salvianolic acids D and E: Two new depsides from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Med.*, *58*, 197-199.
- Ai, C. B., Li, L. N., **1996**. Synthesis of tetramethyl salvianolic acid F and (\pm)-trimethyl przewalskinic acid A. *Chinese Chemical Letters*, *7*, 427-430.
- Allain, H., Bentue – Ferrer, D., Belliard, S., Derausne, C., **1997**. Pharmacology of Alzheimer's disease. In: *Prog. Med. Chem.* (Ellis, C. P., Luscombe, D. K., Eds.) Elsevier Science: Amsterdam, NL, *34*, 1-67.
- Allain, H., Bentue – Ferrer, D., Tribut, O., Gauthier, S., Michel, B.-F., Drieu-La Rochelle, C., **2003**. Alzheimer's disease: the pharmacological pathway. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, *17*, 419-428.
- Arda, N., Goren, N., Kuru, A., Pengsuparp, T., Pezzuto, J. M., Qiu, S. X., Cordell, G. A., **1997**. Saniculoid N from *Sanicula europaea* L. *J. Nat. Prod.*, *60*, 1170-1173.
- Bach, A. W. J., Lan, N. C., Johnson, D. L., Abell, C. W., Bembenek, M. E., Kwan, S. W., Seeburg, P. H., Shih, J. C., **1988**. cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *85*, 4934-4938.
- Bartolini, B., Tipton, K. F., Bianchi, L., Stephenson, D., Cunningham, C., Della Corte, L., **1999**. Determination of monoamine oxidase activity by HPLC with fluorimetric detection. *Neurobiology*, *7*, 109-121.
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., Freeman, B. A., **1990**. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *87*, 1620-1624.
- Birnboim, H. C. and Doly, J., **1979**. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, *7*, 1513-1523.

- Bond, P. A. and Cundall, R. L., **1977**. Properties of monoamine oxidase (MAO) in human blood platelets, plasma, lymphocytes and granulocytes. *Clin. Chim. Acta*, 80, 317-325.
- Bongioanni, P., Mondino, C., Boccardi, B., Borgna, M., Castagna, M., **1996**. Monoamine oxidase molecular activity in platelets of parkinsonian and demented patients. *Neurodegener.*, 5, 351-357.
- Bornkessel, B., **1999**. COMT – Hemmer. *Med. Monatsschr. Pharm.*, 22, 138-141.
- Breakfield, X. and Hsu, Y.-P., **1991**. DNA encoding and method of expressing human monoamine oxidase type A. *U. S. Pat.* 5,030,570.
- Brunner, H. G., Nelen, M., Breakfield, X. O., Ropers, H. H., van Oost, B. A., **1993**. Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science*, 262, 578-580.
- Burns, R., S., Chiuch, C. C., Markey, S. P., Ebert, M. H., Jacobowitz, D. M., Kopin, I. J., **1983**. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 4546-4550.
- Chang, H. M., Chui, K. Y., Tan, F. W. L., Yang, Y., Zhong, Z. P., Lee, C. M., Sham, H. L., Wong, H. N. C., **1991**. Structure – activity relationship of miltirone, an active central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen). *J. Med. Chem.*, 34, 1675-1692.
- Chiba, K., Trevor, A., Castagnoli, Jr., N., **1984**. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 120, 574-578.
- Cohen, G., Pasik, P., Cohen, B., Leist, A., Mytilineou, C., Yahr, M. D., **1984**. Pargyline and deprenyl prevent the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in monkeys. *Eur. J. Pharmacol.*, 106, 209-210.
- Cordell, G. A., Shin, Y. G., **1999**. Finding the needle in the haystack. The dereplication of natural products extracts. *Pure Appl. Chem.*, 71, 1089-1091.
- Cragg, G. M., Newman, D. J., Snader, K. M., **1997**. Natural products in drug discovery and development. *J. Nat. Prod.*, 60, 52-60.
- Da Prada, M., Kettler, R., Keller, H. H., Burkhard, W. P., Muggli – Maniglio, D., Haefely, W. E., **1989**. Neurochemical profile of moclobemide, a short – acting and reversible inhibitor of monoamine oxidase type A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 248, 400-414.

- Danz, H., Stoyanova, S., Wippich, P., Brattström, A., Hamburger, M., **2001**. Identification and isolation of the cyclooxygenase – 2 inhibitory principle in *Isatis tinctoria*. *Planta Med.*, 67, 411-416.
- Davis, G. C., Williams, A. C., Markey, S. P., Ebert, M. H., Caine, E. D., Reichert, C. M., Kopin, I. J., **1979**. Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.*, 1, 249-254.
- Denney, R. M., Fritz, R. R., Patel, N. T., Abell, C. W., **1982**. MAO A and B from human liver separated by immunoaffinity column chromatography using an MAO B – specific monoclonal antibody. *Science*, 215, 1400-1403.
- Donnelly, C. H. and Murphy, D. L., **1977**. Substrate- and inhibitor – related characteristics of human platelet monoamine oxidase. *Biochem. Pharmacol.*, 26, 853-858.
- Dower, W. J., **1990**. In: *Genetic Engineering – Principles and Methods*. (Plenum Publishing Corp., NY) 12, 275-296.
- Du, G. H., Qiu, Y., Zhang, J. T., **2000**. Salvianolic acid B protects the memory functions against transient cerebral ischemia in mice. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 2, 145-152.
- Egashira, T., **1976**. Enzymic properties of placental monoamine oxidase. *Jpn. J. Pharmacol.*, 26, 493-500.
- Findley, L. J., **1995**. Selective Monoamine Oxidase – B inhibitor (Deprenyl) in Parkinson's Disease. In: *Therapy of Parkinson's Disease*. (Koller, W. C. and Paulson, G., Eds.) Marcel Dekker, New York, 311-319.
- Freedman, M., Rewilak, D., Xerri, T., Cohen, S., Gordon, A. S., Shandling, M., Logan, A. G., **1998**. L-deprenyl in Alzheimer's disease: Cognitive and behavioural effects. *Neurology*, 50, 660-668.
- Fritz, R. R., Abell, C. W., Denney, R. M., Denney, C. B., Bessman, J. D., Boeringa, J. A., Castellani, S., Lankford, D. A., Malek – Ahmadi, P., Rose, R. M., **1985**. Platelet MAO concentration and molecular activity: I. New methods using an MAO B – specific monoclonal antibody in a radioimmunoassay. *Psychiatry Res.*, 17, 129-140.
- Gerhäuser, C., Klimo, K., Heiss, E., Neumann, I., Gamal-Eldeen, A., Knauff, J., Liu, G.-Y., Sitthimonchai, S., Frank, N., **2003**. Mechanism – based in vitro screening of potential cancer chemopreventive agents. *Mutat. Res.*, 523-524, 163-172.
- Glover, V., Sandler, M., Owen, F., Riley, G. J., **1977**. Dopamine is a monoamine oxidase B substrate in man. *Nature (London)*, 265, 80-81.

- Gnerre, C., von Poser, G. L., Ferraz, A., Viana, A., Testa, B., Rates, S. M. K., **2001a**. Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. *J. Pharm. Pharmacol.* **53**, 1273-1279.
- Gnerre, C., Thull, U., Gaillard, P., Carrupt, P. A., Testa, B., Fernandes, E., Silva, F., Pinto, M., Pinto, M. M. M., Wolfender, J. L., Hostettmann, K., Cruciani, G., **2001b**. Natural and synthetic xanthenes as monoamine oxidase inhibitors: biological assay and 3D-QSAR. *Helv. Chim. Acta* **84**, 552-570.
- Greenwalt, J. W., Schnaitman, C., **1970**. An appraisal of the use of monoamine oxidase as an enzyme marker for the outer membrane of rat liver mitochondria. *J. Cell Biol.*, **46**, 173-179.
- Guanhua, D., Juntian, Z., **1997**. Protective effects of salvianolic acid A against impairment of memory induced by cerebral ischemia – reperfusion in mice. *Chin. Med. J. (Engl.)*, **110**, 65-68.
- Hamburger, M., **2003**. Tracking bioactivity in plant extracts – new concepts and approaches. In: *Society for Medicinal Plant Research: 50 years 1953 – 2003: a jubilee edition*, WVG, Stuttgart, 109-122.
- Hamburger, M., Danz, H., Dittmann, K., **2002**. HPLC – based discovery of active natural products. *Screening – Trends Drug Discov.*, **2**, 32-35.
- Hamburger, M., Hostettmann, K., **1991**. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, **30**, 3864-3874.
- Hanahan, D., **1983**. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
- HagerROM: Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe, **2003**. Springer – Verlag, Berlin Heidelberg.
- Han, Y. N., Ryu, S. Y., Han, B. H., **1990**. Antioxidant activity of resveratrol closely correlates with its monoamine oxidase A inhibitory activity. *Arch. Pharm. Res.* **13**, 132-135.
- Harada, M., Nagatsu, T., **1973**. A sensitive fluorometric assay for monoamine oxidase activity. *Anal. Biochem.*, **56**, 283-288.
- Harvey, A., **2000**. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discov. Today*, **5**, 294-300.
- Hase, K., Kasimu, R., Basnet, P., Kadota, S., Namba, T., **1997**. Preventive effect of lithospermate B from *Salvia miltiorrhiza* on experimental hepatitis induced by carbon tetrachloride or D – galactosamine / lipopolysaccharide. *Planta Med.*, **63**, 22-26.

- Heikkila, R. E., Nicklas, W. J., Vyas, I., Duvoisin, R. C., **1985**. Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin toxicity. *Neurosci. Lett.*, 62, 389-394.
- Heiss; E., Herhaus, C., Klimo, K., Bartsch, H., Gerhäuser, C., **2001**. Nuclear factor κ B is a molecular target for sulphoraphane – mediated anti – inflammatory mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 276, 32008-32015.
- Holt, A., Sharman, D. F., Baker, G. B., Palcic, M.M., **1997**. A continuous spectrophotometric assay for monoamine oxidase and related enzymes in tissue homogenates. *Anal. Biochem.*, 244, 384 – 392.
- Homans, A. L., Fuchs, A., **1970**. Direct bioautography on thin – layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *J. Chromatogr.*, 51, 327-329.
- Hsu, Y.- P., Weyler, W., Chen, S., Sims, K. B., Rinehart, W. B., Utterback, M., Powell, J. F., Breakfield, X. O., **1988**. Structural features of human monoamine oxidase A elucidated from cDNA and peptide sequences. *J. Neurochem.*, 51, 1321-1324.
- Huang, K. C., **1999**. In : *The Pharmacology of Chinese Herbs*. CRC Press LLC, 91-94.
- Huang, Y. S., Zhang, J. T., **1992**. Antioxidative effect of three water – soluble components isolated from *Salvia miltiorrhiza* in vitro. *Acta Pharm. Sinica*, 27, 96-100.
- Ikeshiro, Y., Hashimoto, I., Iwamoto, Y., Mase, I., Tomita, Y., **1991**. Diterpenoids from *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry*, 30 (8), 2791-2792.
- Ito, A., Kuwahara, T., Inadome, S., Sagara, Y., **1988**. Molecular cloning of cDNA for rat liver monoamine oxidase B. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 157, 970-976.
- Jenner, P., **1998**. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov. Disord.*, 13, Suppl. 1, 24-34.
- Kamata, K., Iizuka, T., Nagai, M., Kasuya, Y., **1993**. Endothelium – dependent vasodilator effects of the extract from *Salviae miltiorrhizae radix*. A study on the identification of lithospermic acid B in the extracts. *Gen. Pharmacol.*, 24, 977-981.
- Kamata, K., Noguchi, M., Nagai, M., **1994**. Hypotensive effects of lithospermic acid B isolated from the extract of *Salviae miltiorrhizae Radix* in the rat. *Gen. Pharmacol.*, 25, 69-73.
- Kang, H. S., Chung, H. Y., Jung, J. H., Kang, S. S., Choi, J. S., **1997**. Antioxidant effect of *Salvia miltiorrhiza*. *Arch. Pharm. Res.*, 20, 496-500.

- Kato, M., Katayama, T., Iwata, H., Yamamura, M., Matsuoka, Y., Nariat, H., **1998**. In vivo characterization of T-794, a novel reversible inhibitor of monoamine oxidase-A, as an antidepressant with a wide safety margin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 284, 983-990.
- Kearney, E. B., Salach, J. I., Walker, W. H., Seng, R. L., Kenney, W., Zeszotek, E., Singe, T. P., **1971**. The covalently-bound Flavin of hepatic monoamine oxidase. 1. Isolation and sequence of a flavin peptide and evidence for binding at the 8alpha position. *Eur. J. Biochem.*, 24, 321-327.
- Khalil, A. A., Steyn, S., Castagnoli, N., **2000**. Isolation and characterization of a monoamine oxidase inhibitor from tobacco leaves. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 31-35.
- Klebe, J. K., Harris J. V., Sharp, D., Douglas, M. G., **1983**. A general method for polyethyleneglycol – induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene*, 25, 333-341.
- Knoll, J., **1988**. Extension of life span of rats by long – term (-)deprenyl treatment. *Mt. Sinai J. Med.*, 55, 67-74.
- Kochersperger, L. M., Waguespack, A., Patterson, J. C., Hsieh, C. C. W., Weyler, W., Salach, J. I., Denney, R. M., **1985**. Immunological uniqueness of human monoamine oxidases A and B : new evidence from studies with monoclonal antibodies to human MAO A. *J. Neurosci.*, 11, 2874-2881.
- Kohda, H., Takeda, O., Tanaka, S., Yamasaki, K., Yamashita, A., Kurokawa, T., Ishibashi, S., **1989**. Isolation of inhibitors of adenylate cyclase from Dan – shen, the root of *Salvia miltiorrhiza*. *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 1287-1290.
- Kötter, H. U., Hampel, H., **2003**. Mythos Alzheimer – Demenz – Ein Krankheitsbegriff im Wandel. In: *Alzheimer – Demenz. Klinische Verläufe, diagnostische Möglichkeiten, moderne Therapiestrategien*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 14-27.
- Kriegelstein, J., **2002**. Pharmakotherapie der Demenz: Pharmakologie und therapeutische Wirksamkeit der Antidementiva. *Pharm. Unserer Zeit, Jg. 31, Heft 4*, 362-369.
- Kuang, P., Tao, Y., Tian, Y., **1996a**. Effect of radix *Salviae miltiorrhizae* on nitric oxide in cerebral ischemic – reperfusion injury. *J. Tradit. Chin. Med.*, 16, 224-227.
- Kuang, P., Tao, Y., Tian, Y., **1996b**. Radix *Salviae miltiorrhizae* treatment results in decreased lipid peroxidation in reperfusion injury. *J. Tradit. Chin. Med.*, 16, 138-142.
- Kuang, P. Wu, W., Liu, J., Zhang, F., Pu, C., **1991**. The effect of radix *Salviae miltiorrhizae* (RSM) on substance P in cerebral ischemia – animal experiment. *J. Tradit. Chin. Med.*, 11, 123-127.

- Kuang, P., Wu, W., Zhang, F., Liu, J., Pu, C., **1989**. The effect of radix *Salviae miltiorrhizae* on vasoactive intestinal peptide in cerebral ischemia: an animal experiment. *J. Tradit. Chin. Med.*, 9, 203-206.
- Kuang, P., Wu, W., Zhu, K., **1993**. Evidence for amelioration of cellular damage in ischemic rat brain by radix *Salviae miltiorrhizae* treatment – immunocytochemistry and histopathology studies. *J. Tradit. Chin. Med.*, 13, 38-41.
- Kuang, P., Xiang, J., **1994**. Effect of radix *Salviae miltiorrhizae* on EAA and IAA during cerebral ischemia in gerbils: a microdialysis study. *J. Tradit. Chin. Med.*, 14, 45-50.
- Kuwahara, T., Takamoto, S., Ito, A., **1990**. Primary structure of rat monoamine oxidase A deduced from cDNA and its expression in rat tissues. *Agric. Biol. Chem.*, 54, 253-257.
- Lange, H. W., **2002**. Morbus Huntington – Klinik, Diagnose und Therapie. *Psycho*, 28, 479-486.
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., Irwin, I., **1983**. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219, 979-980.
- Langston, J. W., Irwin, I., Langston, E. B., Forno, L. S., **1984**. Pargyline prevents MPTP – induced parkinsonism in primates. *Science*, 225, 1480-1482.
- Lee, A. R., Wu, W. L., Chang, W. L., Lin, H. C., King, M. L. **1987**. Isolation and bioactivity of new tanshinones. *J. Nat. Prod.*, 50, 157-160.
- Lee, C. M., Wong, H. N., Chui, K. Y., Choang, T. F., Hon, P. M., Chang, H. M., **1991**. Miltirone, a central benzodiazepine receptor partial agonist from a Chinese medicinal herb *Salvia miltiorrhiza*. *Neurosci. Lett.*, 127, 237-241.
- Levitt, P., Pintar, J. E., Breakfield X. O., **1982**. Immunocytochemical demonstration of monoamine oxidase B in brain astrocytes and serotonergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 6385-6389.
- Li, M., Hubalek, F., Newton – Vinson, P., Edmondson, D. E., **2002**. High – level expression of human liver monoamine oxidase A in *Pichia pastoris*: comparison with the enzyme expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein. Expr. Purif.*, 24, 152-162.
- Lim, Y. A., Kojima, H., Nakamura, N., Miyashiro, H., Fushimi, H., Komatsu, K., Hattori, M., Shimotohno, K., Gupta, M. P., Correa, M., **1997**. Inhibitory effects of *Cordia spinescens* extracts and their constituents on reverse transcriptase and protease from human immunodeficiency virus. *Phytother. Res.*, 11, 490-495.
- Lirk, P., Hoffman, G., Rieder, J., **2002**. Inducible nitric oxide synthase – time for reappraisal. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, 1, 89-108.

- Liu, G. T., Zhang, T. M., Wang, B. E., Wang, Y. W., **1992**. Protective action of seven natural phenolic compounds against peroxidative damage to biomembranes. *Biochem. Pharmacol.*, **43**, 147-152.
- Lu, G. Unge, T., Owere – Atepo, J. B., Shih, J. C., Ekblom, J., **1996**. Characterization and partial purification of human monoamine oxidase B expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, **7**, 315-322.
- Mandel, M., Higa, A., **1970**. Calcium – dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.*, **53**, 154-162.
- Maniatis, T., Fritsch E. F., Sambrook J., **1982**. In: *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Mazumder, A., Neamati, N., Sunder, S., Schulz, J., Pertz, H., Eich, E., Pommier, Y., **1997**. Curcumin analogs with altered potencies against HIV – 1 integrase as probes for biochemical mechanisms of drug action. *J. Med. Chem.*, **40**, 3057-3063.
- McKenna, D. J., Towers, G. H. N., Abbott, F. **1984**. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: tryptamine and ? -carboline constituents of *Ayahuasca*. *J. Ethnopharmacol.* **10**, 195-223.
- Mertens, S., **2002**. Medizinreport: Alzheimer – Krankheit: Potenzielle therapeutische Ansätze. *Deutsches Ärzteblatt, Jg. 99, Heft 36*, 2307-2308.
- Meyerson, L. R., Mc Murtrey, K. D., Davis, V. E., **1978**. A rapid and sensitive potentiometric assay for monoamine oxidase using an ammonia – selective electrode. *Anal. Biochem.*, **86**, 287-297.
- Mitchel, D. A., Marshall T. K., Deschenes R. J., **1993**. Vectors for the inducible overexpression of glutathion S – transferase fusion proteins in yeast. *Yeast*, **9**, 715-723.
- Morinan, A., Garratt, H. M., **1985**. An improved fluorimetric assay for brain monoamine oxidase. *J. Pharmacol. Methods.*, **13**, 213-223.
- Müller – Oerlinghausen, B., **2003** Medikamentöse Therapie von Osteoporose, Alzheimer – Krankheit und Morbus Parkinson. *Deutsches Ärzteblatt, Jg. 100, Heft 16*, 1074-1075.
- Nagy, G., Yang, M.-H., Günther, G., Blunden, G., Crabb, T., Mathe, I., **1998**. Tanshinone-type diterpenes from the roots of *Salvia glutinosa*. *Pharm. Pharmacol. Lett.* , **8**, 37-38.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M., **2003**. Natural products as sources of new drugs over the period 1981 – 2002. *J. Nat. Prod.*, **66**, 1022-1037.
- Newton – Vinson, P., Hubalek, F., Edmondson, D. E., **2000**. High – level expression of human liver monoamine oxidase B in *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.*, **20**, 334-345.

- Ng, T. B., Liu, F., Wang, Z. T., **2000**. Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sci.*, *66*, 709-723.
- O'Brien, E. M., Kiely, K. A., Tipton, K. F., **1993**. A discontinuous luminometric assay for monoamine oxidase. *Biochem. Pharmacol.*, *46*, 1301-1306.
- Otsuka, S., Kobayashi, K., **1964**. Radioisotopic assay for monoamine oxidase determination in human plasma. *Biochem. Pharmacol.*, *13*, 995-1006.
- Peigen, K., Yi, T., Yaping, T., **1996**. Effect of radix salviae miltiorrhizae on nitric oxide in cerebral ischemic – reperfusion injury. *J. Tradit. Chin. Med.*, *16*, 224-227.
- Powell, J. F., Hsu, Y. P., Weyler, W., Chen, S., Salach, J., Andrikopoulos, K., Mallet, J., Breakfield, X. O., **1989**. The primary structure of bovine monoamine oxidase A. Comparison with peptide sequences of bovine monoamine oxidase type B and other flavoenzymes. *Biochem. J.*, *259*, 407-413.
- Riederer, P. and Jellinger, K., **1983**. Neurochemical insights into monoamine oxidase inhibitors, with special reference to deprenyl (selegiline). *Acta Neurol. Scand. Suppl.*, *95*, 43-55.
- Riess, O., Krüger, H., Schöls, L., Kösel, S., Graeber, M. B., **1999**. Zur Genetik und Pathogenese des Morbus Parkinson. *Deutsches Ärzteblatt*, *Jg. 96, Heft 43*, 2739-2748.
- Riley, L. A., Waguespack, M. A., Denney, R. M., **1989**. Characterization and quantitation of monoamine oxidases A and B in mitochondria from human placenta. *Mol. Pharmacol.*, *36*, 54-60.
- Rommelspacher, H., May, T., Salewski, B., **1994**. Harman (1 – methyl – beta – carboline) is a natural inhibitor of monoamine oxidase type A in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, *252*, 51-59.
- Roth, J. A., Rivett, A. J., Francis, A., Pearce, L. B., Jeffrey, D., **1984**. In: *Monoamine oxidase and Disease: Prospects for therapy with Reversible inhibitors*. (Tipton, K. F., Dostert, P., Benedetti, M. S.) Academic Press, London, 459-468.
- Ryu, S. Y., Lee, C. O., Choi, S. U., **1997**. In vitro cytotoxicity of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Med.*, *63*, 339-342.
- Ryu, S. Y., No, Z., Kim, S. H., Ahn, J. W., **1997**. Two novel abietane diterpenes from *Salvia miltiorrhiza*. *Planta Med.*, *63*, 44-46.
- Sairafianpour, M., Christensen, J., Staerk, D., Budnik, B. A., Kharazmi, A., Bagherzadeh, K., Jaroszewski, J. W., **2001**. Leishmanicidal, antiplasmodial and cytotoxic activity of novel diterpenoid 1,2-quinones from *Perovskia abrotanoides*: new sources of tanshinones. *J. Nat. Prod.*, *64*, 1398-1403.

- Salach, J. I., **1979**. Monoamine oxidase from beef liver mitochondria: simplified isolation procedure, properties, and determination of its cysteinyl flavin content. *Arch. Biochem. Biophys.*, *192*, 128-137.
- Sano, M., Ernesto, C., Ronald, M. S., Thomas, R. G., Klauber, M. R., et al., **1997**. A controlled trial of selegiline or α -tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* *336*, 1216-1222.
- Shih, J. C., Chen, K., Ridd, M. J., **1999**. Monoamine oxidase: From genes to behavior. *Annu. Rev. Neurosci.*, *22*, 197-217.
- Schmidt, K., Li, Z., Schubert, B., Huang, B., Stoyanova, S., Hamburger, M., **2003**. Screening of entomopathogenic Deuteromycetes for activities on targets involved in degenerative diseases of the central nervous system. *J. Ethnopharmacol.*, *89*, 251-260.
- Shu, Y. – Z., **1998**. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.*, *61*, 1053-1071.
- Singer, T. P., **1987**. Perspectives in MAO: Past, present and future. *J. Neural Trans. Suppl.*, *23*, 1-23.
- Snyder, S. H., Hendley, E. D., **1968**. A simple and sensitive fluorescence assay for monoamine oxidase and diamine oxidase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, *163*, 386-392.
- Stadt, M.A., Banks, P.A., Kobes, R.D., **1982**. Purification of rat liver monoamine oxidase by octyl glucoside extraction and reconstruction. *Arch. Biochem. Biophys.*, *214*, 223-230.
- Sung, H. J., Choi, S. M., Yoon, Y., An, K. S., **1999**. Tanshinone II A, an ingredient of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, induces apoptosis in human leukemia cell lines through the activation of caspase – 3. *Exp. Mol. Med.*, *31*, 174-178.
- Suzuki, O., Katsumata, Y., Oya, M., Chari, V. M., Vermes, B., Wagner, H., Hostettmann, K., **1981**. Inhibition of type A and type B monoamine oxidases by naturally occurring xanthenes. *Planta Med.* *42*, 17-21.
- Szutowicz, A., Kobes, R. D., Orsulak, P. J., **1984**. Colorimetric assay for monoamine oxidase in tissues using peroxidase and 2,2'-azinodi(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) as chromogen. *Anal. Biochem.*, *138*, 86-94.
- Takeo, S., Tanonaka, K., Hirai, K., Kawaguchi, K., Ogawa, M., Yagi, A., Fujimoto, K., **1990**. Beneficial effect of tan – shen, an extract from the root of *Salvia*, on post – hypoxic recovery of cardiac contractile force. *Biochem. Pharmacol.*, *40*, 1137-1143.
- Tan, A. K., Weyler, W., Salach, J. I., Singer, T. P., **1991**. Differences in substrate specificities of monoamine oxidase A from human liver and placenta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *181*, 1084-1088.

- Tanaka, T., Morimoto, S., Nonaka, G., Nishioka I., Yokozawa, T., Chung, H. Y., Oura, H., **1989**. Magnesium and ammonium – potassium lithospermates B, the active principles having a uremia – preventive effect from *Salvia miltiorrhiza*. *Chem. Pharmaceut. Bull.*, *37*, 340-344.
- Tang, W., Eisenbrand, G., **1992**. Chinese drugs of plant origin, chemistry, pharmacology and use in traditional modern medicine. *Springer – Verlag, Berlin*, 891-902.
- Tenne, M., Finberg, J. P. M., Youdim, M. B. H., Ulitzur, S., **1985**. A new rapid and sensitive bioluminescence assay for monoamine oxidase. *J. Neurochem.*, *44*, 1378-1384.
- Teuscher, E., **1997**. Biogene Arzneimittel. 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
- Tezuka, Y., Kasimu, R., Basnet, P., Namba, T., Kadota, S., **1997**. Aldose reductase inhibitory constituents of the root of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Chem. Pharm. Bull.*, *45*, 1306-1311.
- Thull, U., Kneubühler, S., Testa, B., Borges, M. F. M., Pinto, M. M. M., **1993**. Substituted xanthenes as selective and reversible Monoamine oxidase A (MAO – A) inhibitors. *Pharm. Res.*, *10*, 1187-1190.
- Tipton, K. F., **1969**. Fluorometric assay for monoamine oxidase. *Anal. Biochem.*, *28*, 318-325.
- Tipton, K. F., **1985**. Determination of monoamine oxidase. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, *7*, 361-367.
- Tipton, K. F., Singer, T. P., **1993**. The radiochemical assay for monoamine oxidase activity. Problems and pitfalls. *Biochem. Pharmacol.*, *46*, 1311-1316.
- Traystman, R. J., Kirsch, J. R., Koehler, R. C., **1991**. Oxygen radical mechanism of brain injury following ischemia and reperfusion. *J. Appl. Physiol.*, *71*, 1185-1195.
- von Korff, R. W., **1979**. Monoamine oxidase: Unanswered questions. In: *Monoamine Oxidase: Structure, Function and Altered Functions*. Academic Press London, 1-7.
- Walker, W. H., Kearney, E. B., Seng, R. L., Singer, T. P., **1971**. The covalently-bound flavin of hepatic monoamine oxidase. 2. Identification and properties of cysteinyl riboflavin. *Eur. J. Biochem.*, *24*, 328-331.
- Wang, J., Wu, J. F., Zhang, J. T., **1999a**. Studies on the anti – cerebral ischemia effect of total salvianolic acid. *Chin. Pharm. Bull.*, *15*, 164-166.
- Wang, J., Zhang, J. T., **1999b**. Anti – cerebral ischemia action and inhibitory effect on glutamate release of total salvianolic acid. *Chin. J. Pharmacol. Toxicol.*, *13*, 197-199.

- Weissbach, H., Smith, T. E., Daly, J. W., Witkop, B., Udenfriend, S., **1960**. A rapid spectrophotometric assay of Monoamine oxidase based on the rate of disappearance of kynuramine. *J. Biol. Chem.*, 235, 1160-1163.
- Weng, X. C., Gordon, M. H., **1992**. Antioxidant activity of quinones extracted from tanshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1331-1336.
- Westlund, K. N., Denney, R. M., Kochersperger, L. M., Rose, R. M., Abell, C. W., **1985**. Distinct monamine oxidase A and B populations in primate brain. *Science*, 230, 181-183.
- Westlund, K. N., Denney, R. M., Rose, R. M., Abell, C. W., **1988**. Localization of distinct monoamine oxidase A and monoamine oxidase B cell populations in human brain stem. *Neuroscience*, 25, 439-456.
- Weyler, W., Salach, J. I., **1985**. Purification and properties of mitochondrial monoamine oxidase A from human placenta. *J. Biol. Chem.*, 260, 13199-13207.
- Weyler, W., Titlow, C. C., Salach, J. I., **1990**. Catalytically active monoamine oxidase type A from human liver expressed in *Saccharomyces cerevisiae* contains covalent FAD. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 173, 1205-1211.
- Wolfender, J. L., Terreaux, C., Hostettmann, K., **2000**. The importance of LC – MS and LC – NMR in the discovery of new lead compounds from plants. *Pharm. Biol. Suppl.*, 38, 41-54.
- Wu, W. L., Chang, W. L., Chen, C. F., **1991**. Cytotoxic activities of tanshinones against human carcinoma cell lines. *Am. J. Chin. Med.*, 19, 207-216.
- Wu, Y. J., Hong, C. Y., Lin, S. J., Wu, P., Shiao, M. S., **1998**. Increase of vitamin E content in LDL and reduction of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by a water – soluble antioxidant – rich fraction of *Salvia miltiorrhiza*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 18, 481-486.
- Wurtman, R. J., Axelrod, J., **1963**. A sensitive and specific assay for the estimation of monoamine oxidase. *Biochem. Pharmacol.*, 12, 1439-1441.
- Yang, M.-H., Blunden, G., Xu, Y.-X., Nagy, G., Mathe, I., **1996**. Diterpenoids from *Salvia* species. *Pharmaceutical Sciences*, 2, 69-71.
- Yoon, Y., Kim, Y. – O., Jeon, W. – K., Park, H. – J., Sung, H. J., **1999**. Tanshinone II A isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge induced apoptosis in HL60 human premyelotic leukemia cell line. *J. Ethnopharmacol.*, 68, 121-127.
- Youdim, M. B. H., Sourkes, T. L., **1966**. Properties of purified, soluble monoamine oxidase. *Can. J. Biochem.*, 44, 1397-1401.

- Zhang, K., Bao, Y., Wu, P., Rosen, R. T., Ho, C., **1990**. Anti – oxidative components of tanshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). *J. Agric. Food. Chem.*, 38, 1194-1197.
- Zhao, B. L., Jiang, W., Zhao, Y., Hou, J. W., Xin, W. J., **1996**. Scavenging effects of *Salvia miltiorrhiza* on free radicals and its protection for myocardial mitochondrial membranes from ischemia – reperfusion injury. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 38, 1171-1182.
- Zhou, C. X., Kong, L. D., Ye, W. C., Cheng, C. H. K., Tan, R. X., **2001**. Inhibition of Xanthine and Monoamine oxidases by stilbenoids from *Veratrum taliense*. *Planta Med.*, 67, 158-161.
- Zhou, G. Y., Zhao, B. L., Hou, J. W., Ma, G. E., Xin, W. J., **1999**. Protective effects of sodium tanshinone IIA sulphonate against adriamycin – induced lipid peroxidation in mice hearts in vivo and in vitro. *Pharmacol. Res.*, 40, 487-491.
- Zhou, J. J. P., Zhong, B., Silverman, R. B., **1996**. Direct continuous fluorometric assay for monoamine oxidase B. *Anal. Biochem.*, 234, 9-12.
- Zhou, S., Hamburger, M., **1996**. Application of liquid chromatography – atmospheric pressure ionisation mass spectrometry in natural product analysis. Evaluation and optimisation of electrospray and heated nebulizer interfaces. *J. Chromatogr. A*, 755, 189-204.
- Zhou, W., Ruigrok, T. J., **1990**. Protective effect of danshen during myocardial ischemia and reperfusion: an isolated rat heart study. *Am. J. Chin. Med.*, 18, 19-24.

8. Liste der wissenschaftlichen Beiträge

8.1. Beiträge auf wissenschaftlichen Tagungen

Poster

Dittmann, K., Hamburger, M.: Monoamine oxidase inhibitory diterpenoids from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Lamiaceae). Phytochemical Society of Europe: International Symposium “Lead compounds from higher plants”, Lausanne (2001).

Dittmann, K., Hamburger, M.: Monoamine oxidase inhibitory activity of abietane diterpenoids from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Lamiaceae). Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft: European Graduate Student Meeting, Frankfurt (Main) (2002).

Dittmann, K., Gerhäuser, C., Klimo, K., Hamburger, M.: Monoamine oxidase (MAO) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitory activity of *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Lamiaceae). Society for Medicinal Plant Research: 50th Annual Congress, Barcelona (2002).

Kurzvortrag

Dittmann, K., Riese, U., Hamburger, M.: HPLC – based bioactivity profiling – development of an assay for the identification of monoamine oxidase A inhibitors using human recombinant MAO A. Society for Medicinal Plant Research: 51st Annual Congress, Kiel (2003).

8.2. Veröffentlichungen

Dittmann, K., Riese, U., Hamburger, M., HPLC – based bioactivity profiling of plant extracts: an assay for the identification of monoamine oxidase A inhibitors using human recombinant monoamine oxidase A. *Anal. Biochem.*, eingereicht November 2003.

Hamburger, M., Danz, H., Dittmann, K., **2002**. HPLC – based discovery of active natural products. *Screening – Trends Drug Discov.*, 2, 32-35.

Hamburger, M., Danz, H., Dittmann, K., **2002**. HPLC – basierte Auffindung biologisch aktiver Naturstoffe. *Bioforum – Forschung und Entwicklung*, 4, 182-185.

Hamburger, M., Riese, U., Graf, H., Melzig, M. F., Ciesielski, S., Baumann, D., Dittmann, K., Wegner, C., **2002**. Constituents in evening primrose oil with radical scavenging, cyclooxygenase, and neutrophil elastase inhibitory activities. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 5533-5538.

8.3. Patentanmeldung

Titel: Hemmstoffe für die Monominoxidasen A und/oder B und Verwendung derselben.

Anmelder: Friedrich – Schiller – Universität Jena

Erfinder: Hamburger, Matthias; Dittmann, Kathrin

Anmeldedatum: 07.09.2001

Anmeldenummer: 10145129

Veröffentlichungsdatum: 27.03.2003

9. Anhang

Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. Matthias Hamburger für die Überlassung des interessanten Themas und für zahlreiche Hilfestellungen und Ideen zu praktischen und theoretischen Aspekten der Arbeit bedanken.

Neben allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Friedrich – Schiller – Universität Jena, denen ich für das sehr angenehme Arbeitsklima danken möchte, gilt mein besonderer Dank Frau Dr. Ulrike Riese. Sie hat mich vor allem im Rahmen der Gewinnung des Enzyms sowohl theoretisch als auch praktisch sehr unterstützt, und stand ebenso bei anderen experimentellen Problemen und Fragestellungen immer beratend zur Seite.

Die Arbeiten zur Klonierung konnten am Lehrstuhl für Angewandte und ökologische Mikrobiologie der FSU Jena durchgeführt werden. Für die Möglichkeit der Nutzung der Laborräume und der notwendigen Geräte möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. G. Diekert und Dr. A. Siebert bedanken.

Für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Fermentation und anschließende Weiterverarbeitung der Hefezellen am Hans – Knöll – Institut für Naturstoffforschung e. V., in der Abteilung Angewandte Mikrobiologie, möchte ich mich bei Dr. M. Ramm und U. Knüpfer recht herzlich bedanken.

Die Testungen der Extrakte von *Salvia miltiorrhiza* Bunge in entzündungsrelevanten Testsystemen wurden am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg in der Abteilung für Chemoprävention C010-2 unter der Leitung von Frau Dr. C. Gerhäuser durchgeführt. Dafür bin ich ihr und ihren Mitarbeitern sehr verbunden.

Die NMR – Untersuchungen zur Strukturaufklärung der isolierten Verbindungen wurden freundlicher Weise von Herrn Dr. Günther am Institut für Organische Chemie der FSU Jena vorgenommen.

Besonderer Dank gilt nicht zuletzt meiner Familie und Marcel, die mir immer die für mich sehr wichtige Stabilität, jegliche Unterstützung und Harmonie im privaten Umfeld gaben.

Tabellarischer Lebenslauf

Name:	Kathrin Dittmann
Geburtsort:	Sömmerda
Geburtsdatum:	03. Juni 1975
Familienstand:	ledig
Schulbildung:	1982-1986 Grundschule, Griefstedt
	1986-1990 Polytechnische Oberschule „Erich Weinert“, Kindelbrück
	1990-1991 Polytechnische Oberschule „Geschwister Scholl“, Weißensee
	1991-1994 Staatliches Gymnasium „Albert Schweitzer“, Sömmerda Abitur mit dem Prädikat „Sehr gut“
Studium:	1994-1999 Pharmaziestudium an der Friedrich – Schiller – Universität Jena Abschluss mit dem Prädikat „Gut“
	2000 Approbation als Apothekerin
	2000-2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Friedrich – Schiller – Universität Jena; Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Hamburger Thema: „Neue Bioaktivitäten von <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge (Lamiaceae) – Aktivitätsprofiling, Methodenentwicklung und Charakterisierung isolierter Verbindungen“

Jena, 29. März 2004

Selbständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie der Biologisch – Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich – Schiller – Universität Jena zwischen Januar 2000 und Dezember 2003 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. Hamburger.

Ich erkläre,

- dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe,
- dass diese Arbeit weder identisch noch teildentisch mit einer Arbeit ist, welche an der Friedrich – Schiller – Universität Jena oder einer anderen Hochschule zur Erlangung eines akademischen Grades oder als Prüfungsleistung vorgelegt worden ist und
- dass mir die Promotionsordnung der Biologisch – Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich – Schiller – Universität Jena bekannt ist.

Kathrin Dittmann

Jena, 29. März 2004